N° d'ordre : 398

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Jean-Claude LATCHÉ

QUELQUES ASPECTS DU MÉTABOLISME AZOTÉ DU CARPOPHORE *D'Agaricus bisporus* **Lge.** ÉTUDE EN FONCTION DU PHÉNOMÈNE DES VOLÉES

Soutenue le 10 Juin 1970 devant la Commission d'Examen

MM. A. BRUNEL — *Président*

H. DURANTON, A. TOUZÉ, J. DELMAS — *Examinateurs*

N° d'ordre : 398

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Jean-Claude LATCHÉ

QUELQUES ASPECTS DU MÉTABOLISME AZOTÉ DU CARPOPHORE *D'Agaricus bisporus* **Lge.** ÉTUDE EN FONCTION DU PHÉNOMÈNE DES VOLÉES

Soutenue le 10 Juin 1970 devant la Commission d'Examen

MM.	A. BRUNEL	*Président*
	H. DURANTON	*Examinateurs*
	A. TOUZÉ	
	J. DELMAS	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE DES SCIENCES

PERSONNEL ADMINISTRATION

M. MATHIS : Président du Conseil Transitoire de Gestion.
M. A G I D : Assesseur
M. PRINEAU : Conseiller Administratif des Services Universitaires.
M. LELUBRE : Assesseur.

H O N O R A R I A T

M. CAPDECOMME.....Doyen honoraire, Recteur Honoraire
M. DELTHEIL.....Recteur honoraire, Doyen honoraire Professeur honoraire.
M. DUPOUY.....Doyen honoraire, Membre de l'Institut, Directeur honoraire du C.N.R.S.
M. DURAND.....Doyen honoraire.
M. FOUCHE.....Professeur honoraire.
M. GAUSSENS.....Professeur Honoraire, Correspondant de l'Institut.
M. JACQUES.....Professeur Honoraire.
M. MIGNONAC.....Professeur honoraire.
M. MORQUER.....Professeur honoraire, correspondant de l'Institut.
M. VANDEL.....Professeur honoraire, Membre de l'Institut
M. TEISSIE-SOLIER Professeur honoraire.

P R O F E S S E U R S

M. ESCANDE.....Mécanique des fluides, Membre de l'Institut.
M. DUPOUY.....Physique, Membre de l'Institut.
M. CASTERAS.....Géologie,Correspondant de l'Institut
M. GRUAT.....Mécanique des Fluides : Hydraulique.
M. BEDOS.....Chimie.
M. CAPDECOMME.....Minéralogie.
M. DUPIN.....Radioélectricité.
M. NOUVEL.....Biologie générale.
M. GALLAIS.....Chimie,Correspondant de l'Institut
M. DURAND.....Physique.
M. FERT.....Physique.
M. DIEHL.....Agronomie.
M. LESBRE.....Chimie organique.
M. BRUNEL.....Physiologie végétale.
M. HURON.....Mathématiques appliquées.
M. MARGULIS.....Pédologie.
M. TRICHE.....Chimie analytique & spectrographie.
M. LEDOUX.....Zoologie appliquée.
M. RIVALS.....Agriculture.
M. PERRIER.....Physique.
M. MATHIS.....Chimie.
M. ORLIAC.....Géochimie & Minéralogie.
M. LAFOURCADE.....Physique.
M. ANGELIER.....Zoologie.
Mlle de FERRE.....Botanique.
M. FARRAN.....Minéralogie & Géotechnique.
M. LAUDET.....Physique théorique & Calcul Numérique.
M. SERFATY.....Biologie animale.
M. NOUGARO.....Hydraulique générale & appliquée.
M. LAGASSE.....Electrotechnique.
M. GARDY.....Génie chimique.
M. BLANC.....Physique nucléaire.
M. BIREBENT.....Electronique appliquée.
M. VOIGT.....Chimie minérale.
M. LEREDDE.....Botanique.
M. LELUBRE.....Géologie.
M. TROCHAIN.....Botanique.
M. MASDUPUY.....Chimie.
M. LALAGUË.....Mathématiques générales.
M. DESSENS.....Physique du globe, correspondant de l'Institut.
M. BOUIGUE.....Astronomie.
M. COUCHET.....Physique.
M. LEJEUNE.....Chimie.
M. LASCOMBES....Botanique.
M. ASSELINEAU...Chimie biologique.
M. MAURET.....Chimie systématique.
M. AGID.....Physiologie.
M. MONTANT.....Cryptogamie.
M. GAUTIER.....Physique.
M. CRUMEYROLLE..Mathématiques.
M. GOURINARD....Géologie.
M. PULOU.....Minéralogie.
M. CAMBOU.....Physique spatiale.
M. MIQUEL.....Chimie.
M. LACOSTE.....Eléctrotechnique.
M. THIBAULT.....Mécanique rationnelle et appliquée.
M. MONTEL.....Chimie physique et Electrochimie.
M. MASCART.....Mathématiques.
M. MEDIONI.....Psychophysiologie.
M. THIRRIOT.....Hydrodynamique E.N.S.E.I.H.T.
M. BRENON.....Géologie.
M. LAFON.....Calcul différentiel et intégral.
M. RAYNAUD.P....Physiologie animale.
M. ZALTA.....Chimie biologique.
M. SEVELY.....Electrotechnique.
M. POMMIEZ.....Mathématiques.
M. REY.....Biologie végétale.
M. COULOMB.....Physique.
M. TRINQUIER....Physique.
M. ROQUES.....Chimie Industrielle.
M. GRATELOUP....Génie Electrique.
M. MARONI.....Chimie.
M. BEETSCHEN....Biologie Générale.

P R O F E S S E U R S A S S O C I E S

M. MANSOUR
M. SAKUMA

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. HAMANT..... Botanique.
Mme BRUNEL..... Physiologie végétale.
Mlle BERDUCOU.... Physiologie végétale.

P. PICCA..... Physique.
M. MERIC..... Mathématiques appliquées.

Mme LECAL..... Zoologie.
M. BUGAREL..... Génie chimique;
M. MIROUSE..... Géologie.
M. PILOD..... Physique.
M. LARROQUE..... Physique.
M. BARRANS..... Chimie.

Mme LAFON..... Mathématiques.
Mlle LAPEYRE..... Mathématiques (Informatique)

M. DAT..... Mécanique des fluides
M. JEANNIN..... Chimie minérale.
M. BERTRAND.... Chimie.
M. SATGE..... Chimie organique.
M. DESQ..... Mathématiques.
M. MAHENC..... Chimie.
M. LATTES..... Chimie.
M. ROCARD..... Electronique;
M. DEGEILH..... Physique.
M. FALLOT..... Biologie végétale, (Viticulture et arboriculture).
M. POILBLANC... Chimie.
M. TOUZE.....Physiologie végétale.
M. FRASNAY..... Mathématiques.
M. CASSAGNAU... Zoologie.
M. GUERIN..... Mathématiques.

MAITRES DE CONFERENCES

M. BLANCHARD..... Mathématiques
M. MATHIEU.....Chimie Analytique
M. HOFFMANN..... Electronique.
M. BITSCH..... Zoologie.
M. FONTAN..... Physique nucléaire.
M. PESCIA..... Physique.
M. SICARD..... Biologie génétique.
M. CAUSSINUS..... Mathématiques appliquées.
M. DE LOTH..... Chimie physique.
M. MARTY..... Physique industrielle.
M. BAUDRAS..... Chimie biologique.
M. DURAND Ph..... Physique.
M. LEFEUVRE..... Electronique E.N.S.E.I.H.T.

M. SOUQUET..... Géologie
M. SAPORTE..... Physique
M. ATTEIA..... Mathématiques
M. ENJALBERT... Chimie.
M. IMBERT..... Psychophysiologie.
M. SCHNEIDER... Biologie cellulaire.
M. ANGELINO.... Génie chimique.
M. DABOSI..... E.N.S.C.
M. ETTINGER.... Mathématiques.
M. CALVET..... Mécanique des fluides (E.N.S.E.I.H.T)
M. PAGANI..... Physique.
M. TRANNOY..... Physique (E.N.S.E.I.H.T.)

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

M. P U N
M. J E A N

M. PARKS

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. BEAUFILS;;.... Informatique
M. CASTAGNETTO.L. Mathématiques E.N.S.E.I.H.T.
M. DARROZES..... Mécaniques
M. OLIVIER..... Mathématiques

Melle BARBANCE. Mathématiques

PERSONNEL DE LA FACULTE AFFECTE A L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. CASSIGNOL..... Génie électrique

M. COLETTE..... Physique
M. MASO..... Génie Civil.

MAITRES DE CONFERENCES

M. FAGET..... Physique .
M. TRUCHASSON.... Mécanique.
M. SCHUTTLER..... Physique.

M. MIRA..... Génie électrique.

M. LETURCQ..... Génie électrique.
M. SIRIEYS..... Génie civil

M. DURAND.G.... Chimie.
M. CARRARA..... Physique.
M. CUPPENS..... Mathématiques.

PERSONNEL AFFECTE A L'INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE DE TOULOUSE

MAITRES DE CONFERENCES

M. MARTIN..... Génie électrique
M. THENOZ..... Minéralogie

M.PERENNOU..... Informatique.

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. REY..... Génie électrique

SECRETARIAT

M. PRINEAU .... Conseiller Administratif des Services Universitaires.

A ma Famille,

Cette étude a été réalisée au Centre de Physiologie Végétale, sous la Direction de Madame BRUNEL-CAPELLE, Professeur. Je lui dois, ainsi qu'à Monsieur le Professeur BRUNEL, ma formation de chercheur. Je tiens à lui exprimer ma déférente reconnaissance pour l'aide constante qu'ils m'ont apportée, les conseils et les encouragements qu'ils n'ont cessé de me prodiguer, la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée.

Monsieur DURANTON, Professeur à la Faculté des Sciences de STRASBOURG, a accepté de faire partie de mon jury. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma respectueuse gratidude.

Monsieur le Professeur TOUZÉ a toujours manifesté un profond intérêt pour mon travail. Ses suggestions et ses bienveillantes critiques m'ont été très précieuses. Je lui demande d'accepter mes plus vifs remerciements.

J'ai toujours été reçu avec beaucoup d'amabilité par Monsieur DELMAS, Directeur de la Station d'Agronomie du Centre de Recherches Agronomiques du Sud-Ouest. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir fait bénéficier de sa compétence et d'avoir bien voulu accepter de juger ce mémoire.

Mesdemoiselles M. et G. GOAS, Professeurs à la Faculté des Sciences de RENNES, m'ont initié aux méthodes de recherche lorsque j'étais élève de 3e cycle. Qu'elles soient assurées de ma respectueuse reconnaissance.

J'ai le plaisir de remercier Monsieur BAILLY et Monsieur MANUEL, Champignonnistes, grâce à qui j'ai pu mener à bien les cultures de champignons de couche et obtenir ainsi le matériel végétal sur lequel cette étude a été effectuée.

Mademoiselle BAIDY, Maître-Assistante, Mademoiselle DE SERRES et Monsieur PIQUEMAL, Assistants, ont contribué à la réalisation pratique d'une partie de ce travail. Je tiens à les remercier, espérant pouvoir leur témoigner ma reconnaissance en les aidant à mon tour au cours de leurs propres recherches.

Il m'est agréable d'exprimer ma gratitude à tous mes collègues du Centre de Physiologie Végétale, en particulier à Messieurs CAVALIE, BOUDET, GADAL, Maîtres-Assistants, et à Mesdames GARROS et CAILLIAU, Assistantes. Ils m'ont fait partager leurs connaissances, m'ont initié à des techniques nouvelles et m'ont aidé de leurs conseils et de leurs amicales critiques.

Je ne saurais oublier enfin tout le Personnel Technique et surtout Mesdames CAPDEVILLA et CAMBUS, Mademoiselle FORO, Messieurs DUPONT, ORLEAC et PENAVAYRE qui m'ont apporté une aide inappréciable.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543906_0006

INTRODUCTION

On ne trouve qu'un nombre limité de publications scientifiques consacrées au métabolisme des champignons supérieurs. L'une des difficultés majeures à laquelle on se heurte en abordant un tel sujet réside dans le choix du matériel végétal. Il est rare en effet de pourvoir observer in vitro le cycle de développement complet d'un Basidiomycète et surtout la phase de fructification. L'obtention de carpophores ne peut alors résulter que de cueillettes effectuées dans la nature, aléatoires d'une part, limitées d'autre part à certaines périodes de l'année. Le champignon de couche constitue une exception : outre son importance économique, sa culture aisée et sa reproduction rapide en font un matériel privilégié. Ceci m'a conduit à le retenir comme sujet d'étude et je me propose de présenter brièvement les principaux résultats acquis à ce jour afin de situer, dans un cadre plus général, les recherches que j'ai entreprises.

Dans l'ensemble des travaux relatifs aux Basidiomycètes, le champignon cultivé occupe une place prépondérante. Ses mécanismes respiratoires ont fait en particulier l'objet d'importantes investigations. En 1961, RAST montre que le mannose, le fructose, le glucose, le xylose, la glucosamine, le fructose-6-phosphate et l'acétate sont rapidement métabolisés. Il établit que la dégradation du glucose s'effectue selon la voie d'EMDBEN-MEYERHOFF-PARNAS et que le cycle des acides tricarboxyliques semble être fonctionnel, sans constituer toutefois la seule possibilité d'utilisation du substrat respiratoire. Une autre voie doit également être considérée, vraisemblablement celle des pentoses-phosphates. Cette hypothèse est confirmée par LE ROUX (1966). Après avoir mis en évidence la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la gluconate-6- phosphate déshydrogénase, cet auteur démontre que 25 % de la dégradation du glucose s'effectue selon les réactions de la glycolyse, 75 % selon le cycle des pentoses.

LE ROUX a également envisagé l'intervention du gaz carbonique dans le métabolisme carboné, à la suite d'observations plus anciennes de LAMBERT et de TSCHIERPE. En 1933, LAMBERT avait constaté qu'une concentration en gaz carbonique

supérieure à 1 % provoque des déformations typiques du carpophore, se traduisant par une élongation du stipe et une réduction de la taille du chapeau. TSCHIERPE (1959 a) apporte quelques précisions supplémentaires. Une richesse en CO_2 supérieure à 11 % amène la mort du carpophore sans modifier sa forme. Des teneurs comprises entre 1,5 et 10 % entraînent les déformations décrites par LAMBERT et, dans ces conditions, la sporulation est réduite ou entièrement inhibée.

Selon LE ROUX (1966), après assimilation de $^{14}CO_2$, les acides organiques du champignon de couche sont fortement marqués, la fraction acides aminés libres -essentiellement l'acide aspartique- présentant toutefois la radioactivité la plus élevée. Les mesures de l'activité de la phosphoénol-pyruvate carboxylase ont donné des valeurs extrêmement faibles dans les conditions expérimentales retenues.

Plus récemment, RAST et ses collaborateurs caractérisent l'existence chez Agaricus bisporus de trois accepteurs possibles de CO_2 : l'acétone (RAST et BACHOFEN, 1967), le pyruvate et le phosphoénol-pyruvate (BACHOFEN et RAST, 1968). Les effets particuliers du gaz carbonique sur la morphogénèse des carpophores seraient dûs à des modifications du métabolisme des acides gras et des lipides (WEHRLI et RAST, 1967).

En ce qui concerne le métabolisme azoté, c'est surtout la biosynthèse de l'urée qui a attiré l'attention des chercheurs. La carbamide représente une part importante des composés azotés solubles de certains Basidiomycètes : espèces des genres Agaricus, Leucocoprinus, Lycoperdon et Lepiota. Elle fait, semble-t-il, défaut chez les organismes jeunes et les quantités maximales se rencontrent dans le végétal adulte.

D'après IWANOFF (1923), l'urée des champignons prendrait naissance, par un processus cytoplasmique, aux dépens du gaz carbonique et de l'ammoniac.

BRUNEL (1936), étudiant le métabolisme de l'azote purique chez les champignons, caractérise pour la première fois, dans le mycélium de Sterigmatocystis nigra, une enzyme, l'allantoïcase, responsable de la dégradation de l'acide allantoïque en urée et acide glyoxylique. Il établit ainsi une possibilité de formation enzymatique de l'urée à partir de l'acide urique par l'intermédiaire de la chaîne uricase-allantoïnase-allantoïcase. Il signale toutefois que les espèces du genre Agaricus ont un catabolisme purique peu marqué et que la teneur en acide allantoïque y est toujours faible.

REINBOTHE et TSCHIERSCH (1962) mettent en évidence, grâce à l'emploi de molécules marquées au ^{14}C, l'existence chez Agaricus bisporus et Lycoperdon perlatum, du cycle de KREBS et HENSELEIT (1932), dans lequel l'arginine est le précurseur direct de l'urée. L'intervention de ce cycle expliquerait l'incorporation, dans la molécule de carbamide, du gaz carbonique produit au cours de la dégradation par les carpophores de divers composés : glycine 1-^{14}C, adénine-8-^{14}C (REINBOTHE et TSCHIERSCH, 1962), uracile-2-^{14}C (WASTERNACK et REINBOTHE, 1967).

Le rôle physiologique de l'urée chez les champignons est encore imparfaitement connu. Après avoir montré l'existence de l'uréase dans les carpophores d'Agaricus bisporus et de Lycoperdon pyriforme, REINBOTHE, WASTERNACK et MIERSCH (1967) suggèrent que l'urée pourrait être une forme particulière de réserve azotée pour Lycoperdon et un produit final du catabolisme pour Agaricus. Dans ce dernier cas en effet, il n'a pas été prouvé que l'azote de la carbamide pouvait être réassimilé au cours de la synthèse protéique liée à la formation et à la maturation des spores.

Je me suis, pour ma part, plus particulièrement intéressé au métabolisme des acides aminés du champignon de couche. Plusieurs raisons ont motivé ce choix.

- Les acides aminés constituent une excellente source d'azote assimilable par le champignon. DELMAS (1961) fait remarquer que, dans les composts de culture, ''l'azote doit exister essentiellement sous forme organique (protéines solubles, acides aminés), le champignon de couche ne consommant pas l'azote nitrique et offrant une mauvaise résistance à un taux d'azote ammoniacal trop élevé''. Divers auteurs (TRESCHOW, 1944 ; CASIMIR et HEINEMANN, 1953 ; BOHUS, 1959) ont précisé les besoins alimentaires azotés du mycélium en culture pure et montré le rôle essentiel joué par les aminoacides.

- Le champignon de couche est un végétal riche en azote. De plus, l'utilisation in vivo de divers ''métabolites de base'' marqués au ^{14}C (gaz carbonique, acétate, glucose) conduit chez Agaricus au bout de temps assez courts, à l'accumulation de la majeure partie de la radioactivité du précurseur dans la fraction''acides aminés'' (LE ROUX, 1966). Ces faits suggèrent une synthèse rapide et importante de ces composés.

- Malgré ces constatations, le métabolisme aminé d'Agaricus bisporus n'a fait l'objet que de travaux fragmentaires, les plus importants étant ceux de

HUGHES (1961), qui s'est intéressé aux acides aminés à noyau aromatique, et ceux de LEVENBERG. Cet auteur, en 1962, a mis en lumière le rôle joué par la L-glutamine comme donneur de $-NH_2$ dans la synthèse enzymatique de la citrulline. De plus, ayant isolé un acide aminé nouveau, l'agaritine, il s'est attaché à en préciser l'origine, la synthèse et la dégradation (LEVENBERG, 1961 ; GIGLIOTTI et LEVENBERG, 1964 a, 1964 b).

- Enfin, HUGHES et RHODES en 1959, KISSMEYER-NIELSEN, Mc CLENDON et WOODMANSEE en 1966, ont signalé des modifications dans la composition en acides aminés libres et protéiques des champignons issus des différentes volées * d'une même culture. Une étude des mécanismes physiologiques mis en cause m'a paru présenter un certain intérêt, d'autant que les processus de fructification du champignon de couche sont encore mal connus.

J'ai abordé ce travail par une étude des principaux composés azotés du champignon de couche, Agaricus bisporus Lge, en m'intéressant plus particulièrement à l'évolution des teneurs en aminoacides en fonction du phénomène des volées. J'ai examiné dans une deuxième partie les incidences éventuelles des constituants du compost sur la composition des champignons. Les résultats obtenus m'ont conduit à déterminer, dans une troisième partie, la part prise par les réactions de transamination dans la nutrition azotée et la synthèse des acides aminés. Les problèmes posés par les variations des quantités d'arginine et de proline libres dans les champignons issus des différentes volées d'une même culture ont enfin été envisagés dans une quatrième partie.

---

* On désigne sous le terme de ''volées'' les poussées successives de carpophores se produisant dans une culture sur compost, en champignonnière.

LE MATERIEL VEGETAL

I - SYSTEMATIQUE DU CHAMPIGNON CULTIVE.

Le genre Agaricus L. ex Fr. (= Psalliota) comprend quatre sections (SINGER, 1962) : campestris Konr. et Maubl. (1924), sanguinolenti Schaeff. et Moell., arvensis Konr. et Maubl. (1924) et xanthodermatei Sing. (1948).

Le champignon cultivé appartient à la section campestris. Considéré pendant longtemps comme une variété du champignon de pré, Agaricus campestris L. ex Fr., il en diffère par certains caractères chimiques et anatomiques, l'un des plus important étant le nombre de spores par basides (deux pour la souche cultivée, quatre pour Agaricus campestris). Ces constatations amènent LANGE, en 1926, à le classer dans l'espèce Psalliota hortensis Cooke, var. bispora Lge et SCHAEFFER et MOELLER, en 1938, élèvent cette variété au rang d'espèce, sous le nom de Psalliota bispora Lge, Schaeff. et Moell.. SINGER (1962) se range à ce point de vue et classe le champignon cultivé dans l'espèce Agaricus bisporus Lge, donnant comme synonymes de cette espèce : Psalliota hortensis (Cooke) W.G. Smith var. bispora Lge et Agaricus hortensis (Cooke) Konr. et Maubl. non Fr..La plupart des auteurs désignent actuellement le champignon de couche sous le nom d'Agaricus bisporus Lge et j'ai également adopté cette terminologie.

II - IA CULTURE DU CHAMPIGNON DE COUCHE.

La technique de culture du champignon de couche, qui est restée pendant longtemps le fruit d'observations empiriques, a subi ces dernières années de profondes modifications (DEIMAS, 1961, 1966). Un exposé détaillé sur ce sujet dépasserait le cadre de ce travail et je me bornerai à en donner une description très sommaire, en insistant plus particulièrement sur la phase terminale, seule réalisée au laboratoire. On peut distinguer trois parties.

1 - La préparation du compost. A partir de matières premières diverses (pailles, fumiers, adjuvants minéraux et organiques), elle permet d'obtenir un milieu de culture approprié aux besoins du champignon. Elle comprend essentiellement deux modes de fermentation : une première phase qui a lieu à l'air libre, puis une ''fermentation dirigée et contrôlée'', ou ''pasteurisation'' qui se déroule à 55 -

58° C et en atmosphère saturée en humidité.

2 - Le développement végétatif du mycélium. Le compost préalablement disposé dans des caissettes de bois (longueur : 1 m ; largeur : 50 cm ; heuteur : 12 cm) est ensemencé par saupoudrage à l'aide de ''blancs'' sélectionnés, fournis par des producteurs spécialisés. Le développement végétatif du mycélium est obtenu par incubation à une température de 22 à 24° C, pendant 15 à 20 jours.

Ces diverses opérations nécessitent une pratique culturale poussée et des installations matérielles particulières. Elles n'ont pas été effectuées par nos soins et les caisses de compost m'ont été fournies, après ensemencement et incubation, par des producteurs de la région bordelaise *. La variété blanche de champignons C 63, Le Lion, a été utilisée au cours de ce travail.

3 - La production de carpophores.

a - Culture en caisse. Cette technique est identique à celle normalement utilisée en champignonnière. Le compost est recouvert d'une épaisseur de 2 à 3 cm de terre de gobetage (mélange de terre calcaire et de tourbe) et les caisses sont placées dans une salle conditionnée à une température de 16° C, l'hygrométrie variant entre 80 et 90 % de la saturation. Tout au long de la culture, le compost et la terre de gobetage sont maintenus à un degré d'humidité convenable par arrosages, le plus souvent bi-hebdomadaires, à l'eau distillée.

b - Culture en pots. Le compost envahi par des filaments mycéliens, est transvasé dans des pots de terre cuite de 16 cm de diamètre, chacun d'eux contenant environ 1 kg de compost (poids à l'état frais). Après gobetage, les pots sont déposés dans des caissettes de bois et les intervalles entre les pots sont remplis de tourbe humidifiée afin d'éviter toute dessiccation. Les conditions de culture sont identiques à celles qui ont été exposées ci-dessus.

Cette dernière technique a été retenue pour la réalisation de certaines expériences. Elle a été utilisée avec succès par plusieurs auteurs dont TRESCHOW (1944) et LE ROUX (1966) et donne des résultats analogues à ceux de la culture en caisse classique.

---

* Je remercie Monsieur J. DELMAS, Directeur de la Station d'Agronomie du C.R.A.S.O. et Messieurs J. BAILLY et P. MANUEL, Champignonnistes, qui m'ont permis de réaliser les cultures de champignons.

III - LE PHENOMENE DES VOLEES.

La production de carpophores, qui débute 12 à 15 jours après le gobetage, se fait par poussées successives, ou volées, d'inégale importance. Les résultats obtenus au cours d'une culture en caisse, donnés à titre d'exemple, illustrent ce phénomène (Figure 1, tableau I).

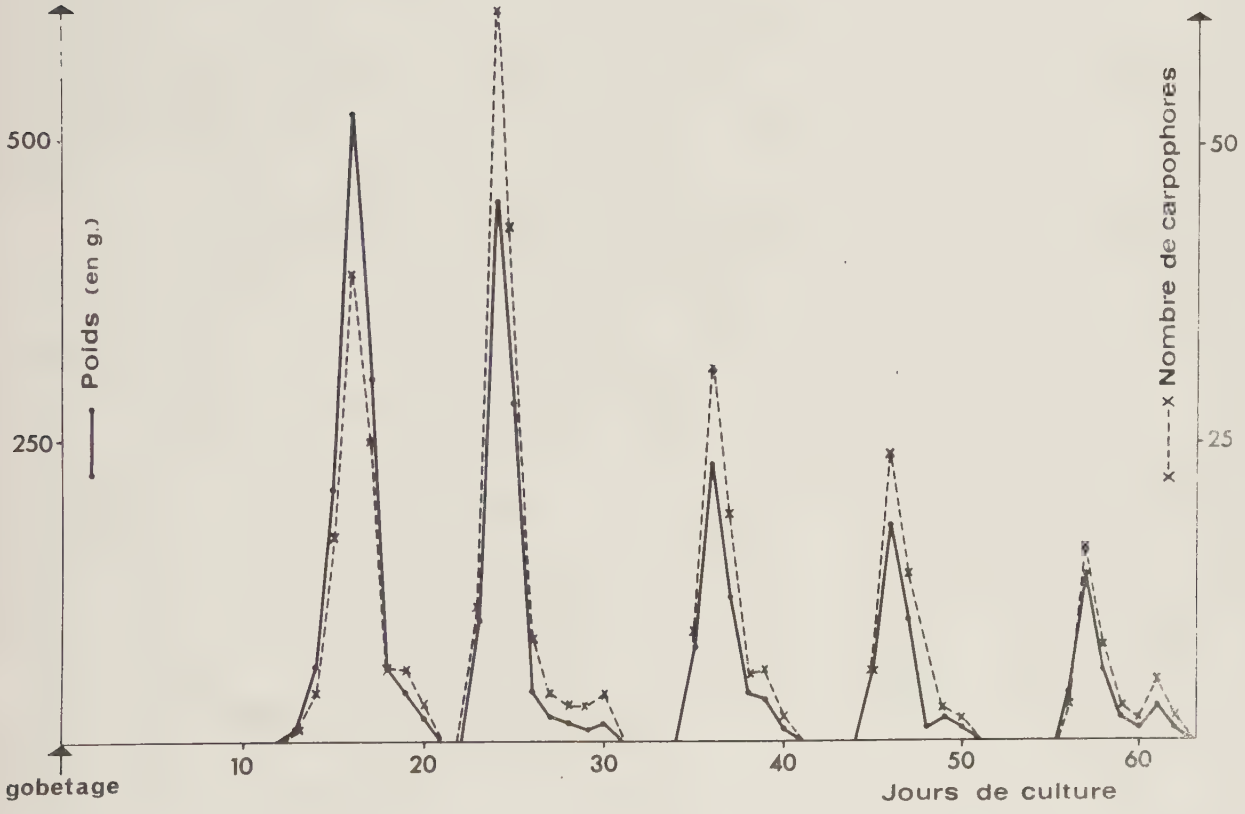


Figure 1 - Courbe de production journalière par caisse d'une culture de champignon, variété C 63, Le Lion

•——•Poids de carpophores récoltés (en g)

x----xNombre de carpophores

TABLEAU I

Rendements, par caisse, d'une culture de champignon C 63, Le Lion.

	1ère volée	2ème volée	3ème volée	4ème volée	5ème volée
Nombre de champignons récoltés	101	137	73	51	39
Poids de matériel frais récolté (en g.)	1220	930	515	380	310
Poids moyens (en g.) des carpophores	12,1	6,8	7,1	7,4	8,0

Les première et deuxième volées représentent en poids respectivement 36,4 et 27,7 % de la récolte globale, les trois dernières (15,4 %, 11,3 % et 9,2 %) étant beaucoup plus réduites. Le rendement total par caisse est de 3355 g. de matériel frais, soit 380 g. de substance sèche ; il est du même ordre que celui obtenu dans une champignonnière (DELMAS, 1961).

Les carpophores issus des volées successives présentent en outre quelques caractéristiques différentes : taille, poids (tableau I), croissance plus rapide à partir de la deuxième volée se traduisant en particulier par une rupture du voile et un étalement du chapeau plus précoces. On note également une aptitude au brunissement plus prononcée à partir de la troisième volée et une résistance moindre aux agents pathogènes (ATKINS, 1955 ; HUGHES et RHODES, 1959).

IV - CHOIX ET RECOLTE DES ECHANTILLONS.

FLEGG et GANDY (1956) ont distingué quatre stades dans la croissance du carpophore :

- ''Pinhead'' : C'est le stade le plus précoce. Chapeau et stipe sont confondus, le voile n'est pas visible.
- ''Button'' : Chapeau et stipe sont bien différenciés, on distingue le voile qui n'est pas encore rompu.
- ''Cup'' : Le voile est partiellement ou totalement déchiré mais la partie périphérique du chapeau est encore visible de dessous.
- ''Flat'' : Le chapeau est complètement étalé et forme un T avec le stipe.

Je me suis inspiré de cette description pour adopter trois stades d'étude en me basant sur :

- la morphologie externe du champignon,
- les proportions respectives, à l'état frais, des différents tissus, définies par les rapports $\frac{\text{poids du chapeau}}{\text{poids du stipe}}$ et $\frac{\text{poids du chapeau}}{\text{poids de l'hyménium}}$, désignés respectivement par C/S et C/H,
- la sporulation : formation et émission des basidiospores,
- la couleur des lamelles qui passe du jaune pâle au brun-rougeâtre en fonction de l'âge du champignon.

Ces stades sont représentés sur la figure 2.

Le stade I correspond sensiblement au ''button'' décrit par FLEGG et GANDY. Le poids moyen des échantillons varie, avec les volées, entre 2 et 3,5 g., le rapport C/S étant compris entre 1,8 et 2,1. Les lamelles, jaunâtres, ont une épaisseur de 1 mm environ et ne représentent qu'une fraction infime du poids total du chapeau.

Le stade II peut être défini comme étant la taille maximum atteinte par un carpophore avant la rupture du voile. Ce stade de croissance a été retenu car il est identique à celui des champignons commercialisés en France. Ses caractéristiques sont les suivantes : poids de 12-13 g. (1ère volée) à 7-8 g. (3ème et 5ème volées), rapports C/S = 2,8 à 3 et C/H = 5,5 en moyenne. Les lamelles sont rosées : un examen microscopique montre que, si certaines basidiospores sont déjà visibles, la plupart ne sont pas encore formées.

Le stade III groupe des champignons âgés, à chapeau étalé et à lamelles rouge brun. Le poids moyen diffère selon les volées : 22 g pour la première, 16,8 g pour la troisième et la cinquième. Le stipe ne représente plus qu'une faible partie du poids total (C/S = 4,5 à 5) ; l'hyménium a par contre atteint un développement maximum (C/H = 2). L'émission de spores, enfin, a déjà débuté.

Les carpophores entiers ont été initialement utilisés pour étudier les variations de composition en fonction de la croissance d'une part, du phénomène des volées d'autre part. La localisation de ces variations dans les différentes parties du champignon a également été précisée. J'ai séparé dans ce but le stipe, le tissu stérile du chapeau et l'hyménium. Le stipe est constitué d'hyphes mycéliennes parallèles et accolées et sa texture, fibreuse, diffère de celle de la par-

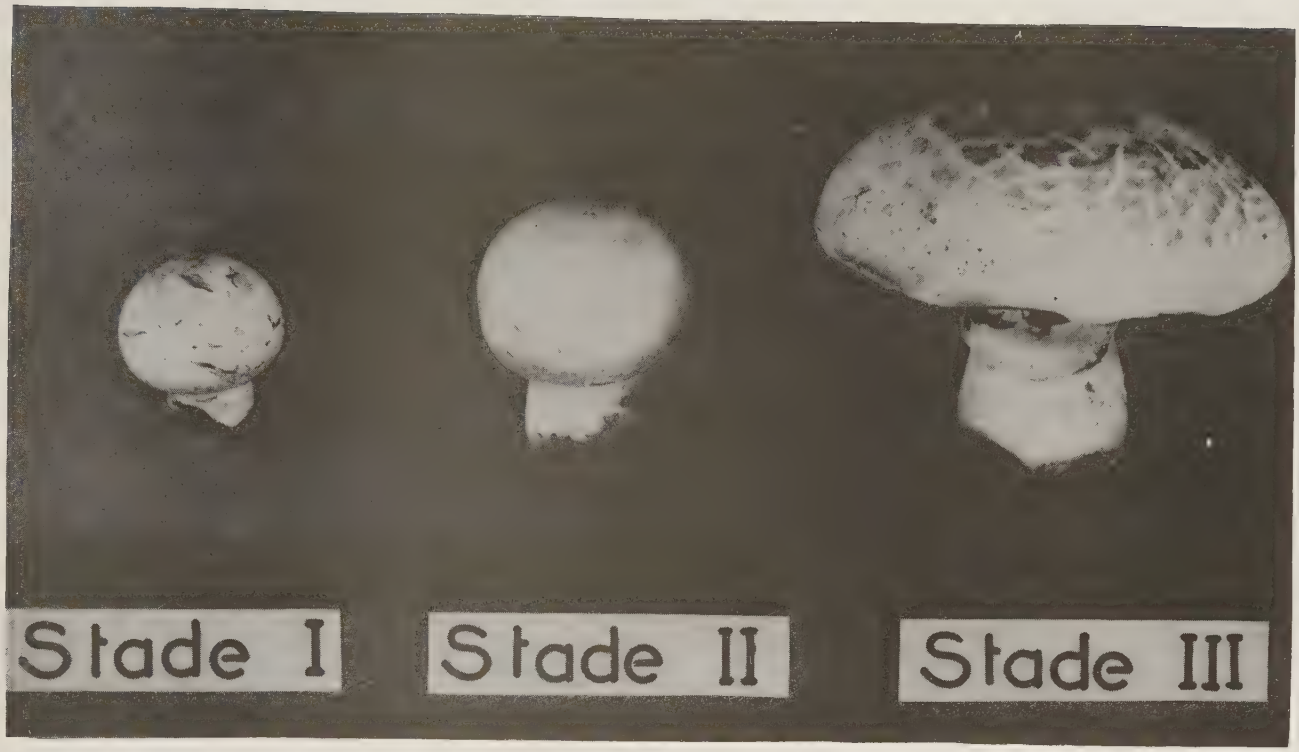


Figure 2 - Différents stades d'étude retenus.

tie stérile du chapeau où les filaments, emmelés et enchevétrés, forment un faux tissu plus compact. L'hyménium possède une morphologie et une fonction bien particulières qui justifient également une étude distincte.

Dans tous les cas, le plus grand soin a été apporté à l'obtention d'échantillons moyens, comprenant un nombre important de carpophores. Les cueillettes sont effectuées au moment où le rendement de la volée est maximum. Elles sont toujours faites le matin, bien que, contrairement aux végétaux supérieurs, aucune constatation ne justifie, à ma connaissance, cette précaution.

La récolte et la préparation des échantillons ne présente aucune difficulté particulière. Les carpophores sont débarrassés avec soin de toute trace de terre de gobetage et les restes de cordons mycéliens adhérant au stipe sont éliminés. Quand une étude des différentes parties du champignon a été réalisée, j'ai retenu le protocole suivant. Les carpophores sont découpés en quatre parties égales suivant deux diamètres perpendiculaires : un quart est utilisé tel quel dans l'échantillon ''champignon entier'' et on sépare, sur les trois quarts restants, le stipe, la fraction stérile du chapeau et les lamelles.

V - STABILISATION DU MATERIEL. DETERMINATION DU POIDS DE MATIERE SECHE.

Lorsqu'il n'est pas utilisé à l'état frais, le matériel végétal est desséché sous vide pendant 48 à 72 heures, à la température du laboratoire et en présence de chlorure de calcium (BRUNEL, 1948). Le matériel sec est conservé sous vide à basse température (- 20° C). Le broyage des échantillons est effectué au moment de leur utilisation à l'aide du broyeur à bille Dangoumau.

La teneur des champignons en matière sèche peut être déterminée par un séchage analogue à celui qui a été décrit à propos de la stabilisation du matériel. Cependant, pour des raisons de commodité, j'ai adopté une dessiccation à chaud (105° C), pendant 7 heures. Il a été vérifié que cette dernière technique, utilisée par DUREAU et DELMAS (1962), donne les mêmes résultats que la précédente. Le taux moyen de substance sèche du carpophore varie, selon les échantillons, entre 10 et 12 % du poids à l'état frais. Il est toujours plus élevé dans le stipe (12 à 15 %) que dans la partie stérile du chapeau ou l'hyménium (9,8 à 11,6 %). Il a enfin tendance à augmenter avec l'âge des champignons.

PREMIERE PARTIE

PRINCIPAUX CONSTITUANTS AZOTES D'*Agaricus bisporus*. LEURS VARIATIONS EN FONCTION DU PHENOMENE DES VOIEES.

A - DONNEES ANALYTIQUES CONCERNANT LES COMPOSES AZOTES DES CHAMPIGNONS DU GENRE *Agaricus*.

B - TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE DOSAGE DES DIFFERENTES FORMES D'AZOTE ET DES COMPOSES AZOTES.

I - Séparation des fractions azotées soluble et insoluble.

II - Détermination des teneurs en azote total, soluble et insoluble.

III - Etude des acides aminés et amides libres.

1 - Détermination qualitative.
2 - Détermination quantitative.
3 - Détermination des teneurs en urée.

IV - Etude des acides aminés de la fraction insoluble.

C - FORMES D'AZOTE ET PRINCIPAUX CONSTITUANTS AZOTES.

I - Formes d'azote.

II - Etude de la fraction azotée soluble.

1 - Analyse qualitative par chromatographie sur papier.
2 - Acides aminés libres.
3 - Amides libres : asparagine, glutamine, urée.

III - Acides aminés de la fraction insoluble.

D - EVOLUTION DES ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES EN FONCTION DE LA CROISSANCE DU CARPOPHORE - LEUR REPARTITION DANS LES DIFFERENTES PARTIES DU CHAMPIGNON.

I - Acides aminés et amides libres en fonction de la croissance.

II - Répartition des acides aminés et amides libres dans les différentes parties du champignon.

E - CONCLUSIONS.

PRINCIPAUX CONSTITUANTS AZOTES d'Agaricus bisporus. LEURS VARIATIONS EN FONCTION DU PHENOMENE DES VOLEES.

A - DONNEES ANALYTIQUES CONCERNANT LES COMPOSES AZOTES DES CHAMPIGNONS DU GENRE Agaricus.

Les premiers travaux consacrés à l'étude des composés azotés des champignons du genre Agaricus datent de la fin du siècle dernier. Les résultats les plus nombreux ont cependant été obtenus depuis 1950 environ, grâce à l'utilisation de techniques de dosage nouvelles et, en particulier, de la chromatographie.

Le champignon cultivé est un matériel relativement riche en azote. KÖNIG, en 1903, a enregistré pour les carpophores des teneurs pouvant atteindre jusqu'à 10 % du poids de substance sèche. Des chiffres légèrement inférieurs (0,5 % du poids de matière fraîche) ont été avancés par FITZPATRICK, ESSELEN et WEIR (1946). Il est toutefois difficile de se prononcer de façon catégorique. Outre des particularités inhérentes à la souche envisagée, les taux d'azote varient en fonction des volées. Selon HUMFEID et SUGIHARA (1952), ils sont également modifiés dans de fortes proportions par la composition du milieu nutritif : le mycélium d'Agaricus campestris cultivé sur un milieu pauvre en éléments azotés (500 mg de N par litre) renferme 3,2 % d'azote, cette teneur passant à 6,9 % si le milieu de culture s'enrichit (3500 mg de N par litre).

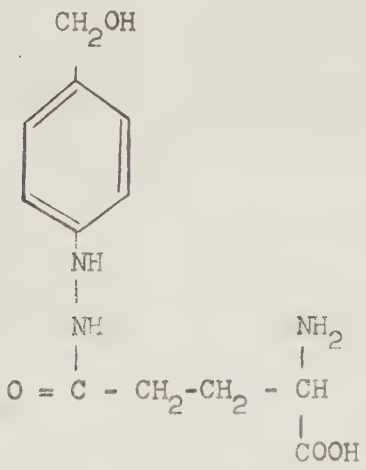
Dès 1927, IWANOFF a attiré l'attention sur la place occupée par l'urée dans la fraction azotée soluble des fructifications d'Agaricus campestris. La quantité de carbamide peut s'élever jusqu'à 13 % du poids de matière sèche et représenter 50 % de l'azote total du champignon. Ce taux toutefois n'est pas constant : il s'accroît en fonction de l'âge du carpophore puis diminue, l'urée pouvant même disparaître entièrement après dispersion des spores.

En ce qui concerne les acides aminés, BLOCK, STEARNS, STEPHENS et Mc CANDLESS (1953) identifient à l'état libre les acides aspartique et glutamique, la glycine, la thréonine, l'α-alanine, la tyrosine, la lysine, l'arginine, l'histidine la valine, la phénylalanine ; l'existence de méthionine, leucine et isoleucine pa-

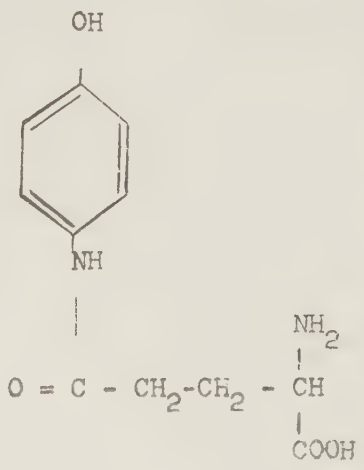
raît plus douteuse.

En 1958, HUGHES, LYNCH et SOMERS rapportent, en plus des composés précités, la présence de sérine, proline, ornithine, citrulline, acide γ-aminobutyrique, β-alanine, acides cystéique, cystine, tryptophane, asparagine et glutamine. J'ai identifié un peu plus tard (LATCHÉ, 1963), la cystathionine et l'acide α-aminoadipique et constaté que les différentes parties du champignon (stipe, partie stérile du chapeau, hyménium) renfermaient des proportions différentes d'aminoacides.

Deux composés originaux, caractéristiques des fructifications d'Agaric, méritent une mention particulière. Il s'agit respectivement de la β-N-(γ-L (+) - glutamyl)- p-hydroxyméthylphénylhydrazine, communément nommée agaritine, (LEVENBERG, 1961 et 1964 ; KELLY, DANIEL et HINMAN, 1961) et du L (+)-γ-(p-hydroxy) anilide de l'acide glutamique (JADOT, CASIMIR et RENARD, 1960). Les formules chimiques proposées pour ces deux corps sont très voisines :



agaritine



anilide

Leur distribution a été envisagée en fonction de la systématique du genre Agaricus par LEVENBERG (1964) et HEINEMANN et CASIMIR (1961).

Je signalerai enfin les résultats d'ALTAMURA, ROBBINS, ANDREOTTI, LONG et HASSELSTROM (1967). Ces auteurs, utilisant une méthode criticable quant à l'extraction quantitative de la majorité des acides aminés ''courants'', caractérisent parmi les substances azotées solubles du champignon cultivé : la sarcosine,

les acides β-aminoisobutyrique et 2-4 diaminobutyrique, l'homocystine, l'homosérine, l'hydroxylysine, la 1-méthylhistidine, la 3-méthylhistidine, la canavanine et la créatine.

Les travaux se rapportant à la fraction azotée insoluble et, plus particulièrement, aux protéines du champignon de couche, sont moins nombreux. Ils ont surtout été effectués afin de déterminer la valeur nutritive des carpophores. Ainsi, SALTET (1885) établit que 75 % des protéines, représentant 69 % de l'azote total d'Agaricus campestris, sont utilisables pour l'alimentation humaine. FITZPATRICK, ESSELEN et WEIR (1946) identifient dans la fraction protéique du champignon cultivé trois acides aminés basiques (histidine, arginine et lysine), la phénylalanine et le tryptophane, la thréonine, la valine, la méthionine, la leucine et l'isoleucine. L'azote protéique représente environ 63 % de l'azote total et la teneur en azote des protéines de l'Agaric serait de 11,79 %.

L'emploi des techniques chromatographiques a enfin permis à HUGHES et RHODES (1959) et à DEIMAS et POITOU (1965) de caractériser, en dehors des composés précédemment cités, l'α-alanine, le glycocolle, la sérine, la tyrosine, la proline, la cystine et les acides aspartique et glutamique.

B - TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE DOSAGE DES DIFFERENTES FORMES D'AZOTE ET DES COMPOSES AZOTES.

I - SEPARATION DES FRACTIONS AZOTEES SOLUBLE ET INSOLUBLE.

Une méthode d'extraction à froid des composés solubles de Pinus pinea a été mise au point par GUITTON (1964). Le mélange défécant utilisé est constitué par une solution aqueuse à 10 % d'acide trichloracétique. Le protocole expérimental retenu pour la séparation des fractions azotées soluble et insoluble d'Agaricus bisporus dérive de cette technique, mais comporte deux modifications :

- Le matériel végétal est extrait à l'état frais. Une dessiccation sous vide, en présence de chlorure de calcium, entraîne, dans le cas du champignon de couche, quelques variations dans la composition de la fraction azotée soluble. On note en particulier une augmentation des teneurs en acide γ-aminobutyrique et une diminution des quantités d'acide glutamique.

- Le temps de contact entre le matériel végétal et l'acide trichloracétique a été réduit. Trop prolongé, il risquerait en effet d'entraîner l'hydrolyse de certaines macromolécules, en particulier des acides nucléiques (HOLGATE et GOODWIN, 1965).

Le mode opératoire suivi est schématisé dans le tableau II. Son adoption a été précédée par un certain nombre de contrôles que je décrirai rapidement.

1 - Le mode de défécation retenu est satisfaisant. Le traitement de la solution S (tableau II) par divers agents de précipitation et de dénaturation des protéines (chaleur, alcool, acides,...) aboutit toujours à des résultats négatifs.

2 - L'extraction des composés azotés solubles est correcte. Trois lots homogènes de matériel (A, B, C) sont constitués. Les deux premiers sont traités selon des méthodes désormais classiques, comportant cinq extractions successives, de 30 minutes chacune, dont trois par l'éthanol à 80° GL, une par l'éthanol à 60° GL et une par l'eau distillée. Dans le cas du lot A, les trois premières opérations sont réalisées à 100° C, les deux dernières à la température ambiante. Pour le lot B, après fixation à l'azote liquide, les cinq traitements sont effectués à 0° C. Le protocole décrit dans le tableau II est utilisé pour le lot C.

TABLEAU II

Protocole de séparation des fractions azotées soluble et insoluble

Matériel frais : 8 g
Fixation dans l'azote liquide, 10 minutes

↓

Brcyage (omnimixer Sorvall), à basse température (eau-glace) dans 25 ml d'eau distillée, 5 minutes

↓

Addition de 32,2 ml d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique (T.C.A.) à 20 % glacée ⟶ concentration finale de 10 % en T.C.A.
Agitation à basse température (eau - glace - sel), 10 minutes

↓

Centrifugation, 10.000 g, - 5° C, 10 minutes

↙ ↘

Culot — surnageant S_1 ⟶

↓

Addition de 10 ml de T.C.A., à 10 %
Agitation à basse température, 10 minutes

↓

Centrifugation, 10.000 g, - 5° C, 10 minutes ⟶ surnageant S_2 ⟶

↓

Culot

↓

2e addition de 10 ml de T.C.A. à 10 %
Agitation à basse température, 10 minutes.

↓

Centrifugation 10.000 g, - 5° C, 10 minutes ⟶ surnageant S_3 ⟶

↓

Culot C
(Fraction N insoluble)
Séchage sous vide, en présence de Cl_2Ca, 72 heures. Broyage (broyeur Dangoumau).

Ensemble des surnageants recueillis quantitativement et dilution à l'eau distillée telle que la teneur finale en T.C.A. = 2,5 %.

= Solution S
(Fraction N soluble)

L'analyse des principaux acides aminés et des amides libres extraits par ces différents traitements conduit aux données groupées dans le tableau III.

TABLEAU III

Comparaison de différentes méthodes d'extraction des composés azotés solubles.

Principaux acides aminés et amides libres en µM/g de matériel sec	Extraction éthanolique à chaud (Lot A)	Extraction éthanolique à froid (Lot B)	Extraction par l'acide trichloracétique (Lot C)
Lysine	44,8	52,9	58,1
Arginine	84,1	91,2	98,4
Ornithine	40,2	46,4	50,1
Acide aspartique	75,4	71,6	68,0
'' glutamique	165,4	150,1	143,4
Glycocolle	27,1	27,8	28,1
α-Alanine	72,1	76,4	73,0
Sérine	36,1	36,8	36,1
Valine	9,1	11,1	10,0
Proline	219,2	228,6	220,3
Glutamine + asparagine	172,1	200,1	201,4

L'extraction des acides aminés basiques (lysine, arginine et ornithine) est meilleure en milieu trichloracétique, le phénomène inverse s'observant, par contre, pour les acides aspartique et glutamique, obtenus en plus grandes quantités en milieu éthanolique. Ces différences sont plus marquées dans le cas de l'extraction éthanolique à chaud : il y aurait vraisemblablement en plus, dans ce dernier cas, une hydrolyse partielle des amides d'une part, une légère altération de certains composés par la chaleur d'autre part. Des faits analogues avaient été signalés par TUGAYÉ et TOUZÉ (1967). Les résultats obtenus autorisent l'emploi de la méthode d'extraction à l'acide trichloracétique, qui a été adoptée dans ce travail.

II - DETERMINATION DES TENEURS EN AZOTE TOTAL, SOLUBLE ET INSOLUBLE.

Les teneurs en azote total et en azote insoluble sont déterminées respectivement sur du matériel stabilisé par séchage sous vide en présence de chlorure de calcium et sur une partie aliquote du culot C (Tableau II), desséché dans les mêmes conditions. Les dosages sont effectués au ''Nitrogen Analyzer Coleman''.

La proportion d'azote soluble est calculée par différence entre les taux d'azote total et d'azote insoluble.

III - ETUDE DES ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES.

1 - Détermination qualitative. L'extrait brut (Solution S, tableau II) est passé sur une colonne de résine Dowex 50, 50-100 mesh, forme H^+, d'où les composés cationiques sont élués par l'ammoniaque N (100 ml), puis 2 N (50 ml). Après concentration de l'éluat par distillation sous pression réduite, à 35° C (évaporateur Büchi), les acides aminés et amides libres sont séparés par chromatographie bi-dimensionnelle sur papier Whatman n° 40. Les solvants retenus sont les mélanges n-butanol - acide acétique - eau (40 - 10 - 50) en première dimension et acide phénique Codex - eau (50 - 50) en seconde. La révélation des acides aminés s'effectue par trempage des chromatogrammes dans une solution de ninhydrine à 0,1 p. 100 dans le n-butanol et chauffage à 100° C. L'urée a été caractérisée à l'aide du réactif d'Ehrlich (SMITH, 1960).

2 - Détermination quantitative. Deux méthodes ont été employées :

a - Dosage à l' ''Amino acid analyzer Beckman''. Cette technique (SPACKMANN, STEIN et MOORE, 1958) a été le plus souvent retenue. L'extrait brut est dilué de moitié à l'aide de tampon citrate - HCl de pH 2,2 et l'analyse est effectuée, sans traitement préalable par échangeurs d'ions. La concentration en acide trichloracétique (1,25 %) ne perturbe pas la séparation et le dosage des aminoacides (GUITTON, 1964). L'asparagine et la glutamine n'étant pas séparées par cette technique, les résultats globaux concernant ces deux amides seront exprimés en équivalent glutamine, composé prépondérant.

b - Dosage selon la méthode de BISERTE et coll. (1960).

Après chromatographie sur papier selon le protocole décrit précédemment et révélation à la ninhydrine, les taches correspondant aux différents composés sont éluées et l'intensité de la coloration obtenue est mesurée au spectrophotomètre. Cette technique est inférieure en précision à la précédente, ce

qui explique son utilisation plus restreinte. Les résultats obtenus sont toutefois satisfaisants (TOUZE-SOULET, 1964).

3 - Détermination des teneurs en urée. L'urée est extraite du matériel végétal, préalablement séché sous vide en présence de Cl_2Ca et réduit en poudre, selon le protocole exposé par BRUNEL (1949). Sa détermination quantitative est effectuée en utilisant la méthode de dosage au xanthydrol de FOSSE (1928).

IV - ETUDE DES ACIDES AMINES DE LA FRACTION INSOLUBLE.

Une partie aliquote (25 mg) du culot C (tableau II) est hydrolysée en tube scellé, en présence d'acide chlorhydrique 6 N (12 ml), à 105° C (BOULANGER et BISERTE, 1950), pendant 40 heures. Une durée d'hydrolyse de 24 heures, habituellement préconisée, conduisait à une libération incomplète des acides aminés. Il a été vérifié que cette prolongation ne provoquait pas d'altérations notables des composés formés.

Après élimination de l'acide chlorhydrique par distillation sous pression réduite, le résidu sec est dissous dans 10 ml de tampon citrate - HCl de pH 2,2 et les teneurs en aminoacides sont déterminées à l' ''Amino acid analyzer Beckman''.

C - FORMES D'AZOTE ET PRINCIPAUX CONSTITUANTS AZOTES.

Après avoir suivi l'évolution, en fonction du phénomène des volées, des taux d'azote total, soluble et insoluble, j'ai déterminé les teneurs en acides aminés et amides libres puis en acides aminés de la fraction insoluble. Cette étude -effectuée à partir de carpophores entiers, variété C 63, Le Lion, récoltés au stade II- s'imposait pour une meilleure connaissance du matériel végétal.

Des variations quantitatives en constituants azotés ont été en effet mises en évidence dans les champignons issus des poussées successives d'une même culture. Selon HUGHES et RHODES (1959), les échantillons de première volée renferment des quantités plus importantes d'ornithine, de tyrosine et de phénylalanine solubles ; ils sont par contre plus pauvres en proline et histidine. La fraction protéique se caractérise, en fonction du temps de récolte, par une diminution de tyrosine et une augmentation d'arginine.

KISSMEYER-NIELSEN, Mc CLENDON et WOODMANSEE (1966) ont obtenu des résultats différents, voire même contradictoires (tableau IV).

TABLEAU IV

Variations, en fonction du phénomène des volées, des concentrations en acides aminés et amides libres des carpophores d'Agaricus bisporus, selon KISSMEYER-NIELSEN, Mc CLENDON et WOODMANSEE (1966).

Teneurs maximales en			
1ère volée	2ème volée	3ème volée	4ème volée
Lysine	Urée	Ornithine	Histidine
Arginine		α-Alanine	Acide aspartique
Acide glutamique		Valine	Thréonine
Phénylalanine		Proline	Sérine
Taurine		Acide cystéique	Isoleucine
			Leucine
			Tyrosine

Enfin, plus récemment, DEIMAS, POITOU et DELPECH (1968 b) ont établi que les carpophores de dernière volée sont plus riches en aminoacides libres que ceux récoltés en début de culture.

I - FORMES D'AZOTE.

Le dosage des différentes formes d'azote des carpophores d'Agaricus bisporus conduit aux données du tableau V. Il paraît utile de rappeler que le terme azote soluble désigne la fraction azotée soluble dans l'acide trichloracétique à 10 %. Des variations ont été en effet constatées, dans les dosages d'azote soluble, selon la nature du défécant employé (BELL, 1963).

TABLEAU V

Azote total, soluble et insoluble.

	Azote total		Azote soluble			Azote insoluble		
	% du poids de matière sèche	µM/g de matériel sec	% du poids de matière sèche	µM/g de matériel sec	% de N total	% du poids de matière sèche	µM/g de matériel sec	% de N total
ère volée	5,3	1893	2,9	1035	55	2,4	858	45
ème volée	6,0	2142	3,0	1071	50	3,0	1071	50
ème volée	8,1	2893	4,5	1607	55	3,6	1286	45
ème volée	6,7	2393	3,5	1250	52	3,2	1143	48
ème volée	6,5	2321	3,8	1357	58	2,7	964	42

Les taux des diverses formes azotées du champignon de couche présentent un optimum en troisième volée. Les quantités d'azote insoluble sont généralement inférieures à celles d'azote soluble, cette différence étant plus marquée en fin de culture. De la première à la cinquième volée, le rapport $\frac{\text{N insoluble}}{\text{N soluble}}$ est successivement 0,83 ; 1,0 ; 0,80 ; 0,91 ; 0,71. Ces valeurs toujours très faibles, semblent être pour la souche d'Agaricus retenue, caractéristiques des fructifications. En effet, dans le mycélium cultivé sur milieu semi-synthétique, la fraction

protéique représente 70 à 80 % de l'azote total (PIQUEMAL, 1970). Des valeurs analogues sont d'ailleurs avancées dans la plupart des bilans azotés relatifs aux champignons (COCHRANE, 1958).

II - ETUDE DE LA FRACTION AZOTEE SOLUBLE.

1 - Analyse qualitative par chromatographie sur papier.

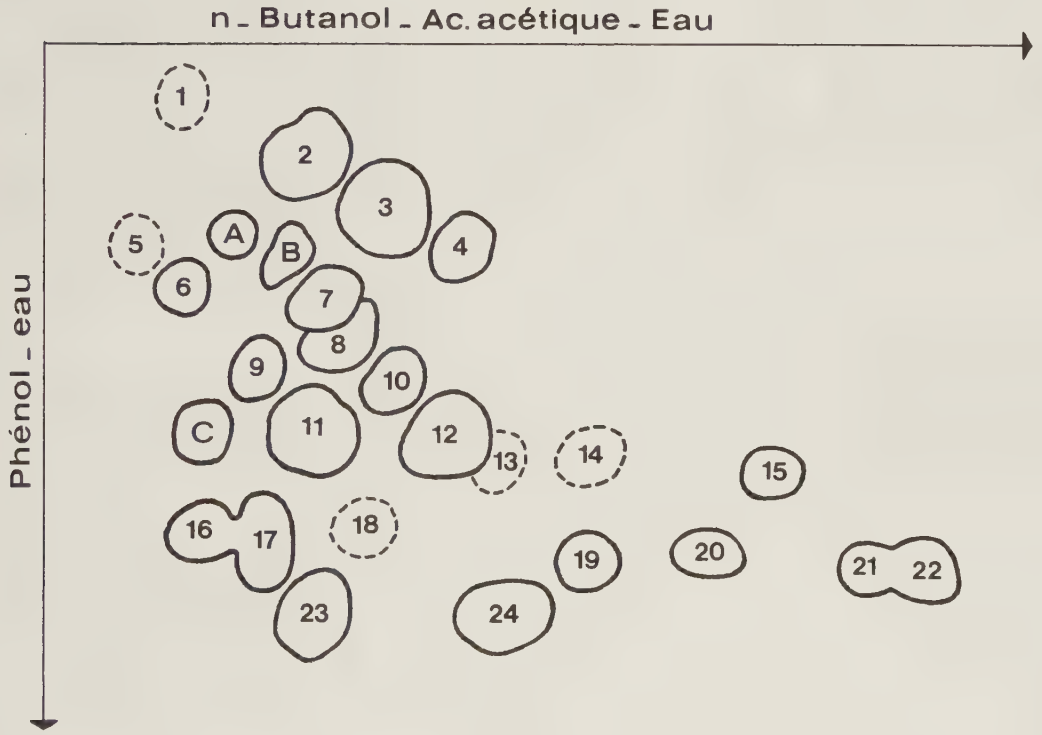


Figure 3 - Schéma d'un chromatogramme des constituants azotés solubles.

1 : ac. cystéique ; 2 : ac. aspartique ; 3 : ac. glutamique ; 4 : ac. α-aminoadipique ; 5 : cystéine ; 6 : cystathionine ; 7 : sérine ; 8 : glycocolle ; 9 : asparagine ; 10 : thréonine ; 11 : glutamine ; 12 : α-alanine ; 13 : β-alanine ; 14 : tyrosine ; 15 : urée ; 16-17 : ornithine, lysine, histidine ; 18 : citrulline ; 19 : ac. ϑ-aminobutyrique ; 20 : valine, méthionine ; 21 : phénylalanine ; 22 : leucine, isoleucine ; 23 : arginine ; 24 : proline.

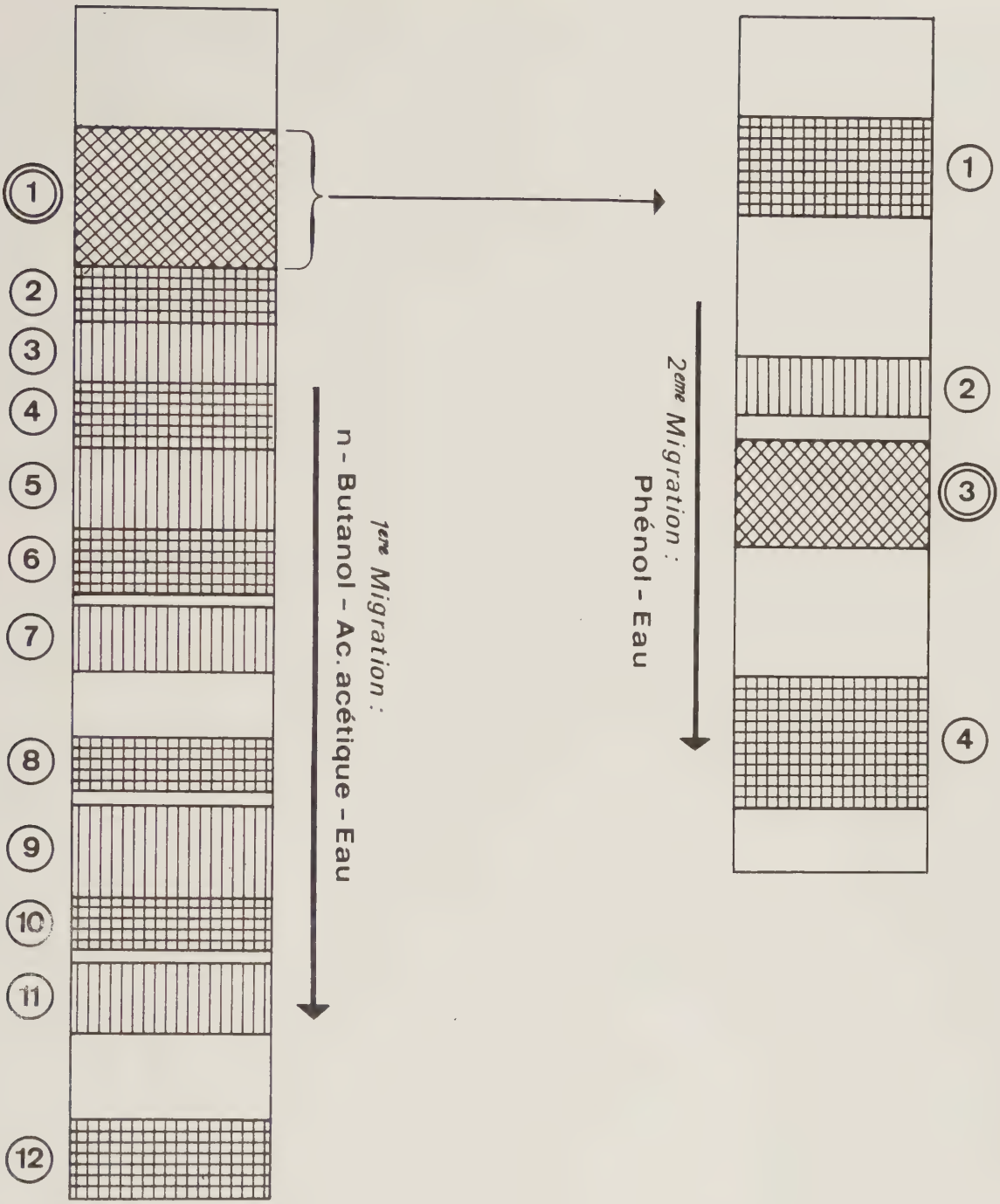


Figure 4 - Isolement du peptide C par chromatographie en bande

1ere migration : 1 : Peptide C, histidine, lysine, ornithine, acides aminés soufrés ; 2 : asparagine ; 3 : arginine ; 4 : glutamine, sérine, glycocolle ; 6 : α-alanine, acide α-aminoadipique ; 7 : proline ; 8 : β-alanine ; 9 : acide ϭ-aminobutyrique ; 10 : tyrosine ; 11 : valine, méthionine ; 12 : phénylalanine, leucine, isoleucine.

2eme migration : 1 : acides aminés soufrés ; 2 : asparagine ; 3 : Peptide C ; 4 : histidine, lysine,

La figure 3 représente un chromatogramme obtenu à partir de la fraction azotée soluble des carpophores de troisième volée. Les taches les plus importantes correspondent à l'acide glutamique, l'α-alanine, l'arginine, la proline, la glutamine et l'urée. L'acide aspartique, le glycocolle, la sérine, la thréonine, l'acide γ-aminobutyrique et l'asparagine existent également en quantités notables. La tyrosine, l'acide cystéique, la cystine, la cystathionine, la β-alanine et la citrulline sont présents à l'état de traces. L'acide α-aminoadipique, identifié par cochromatographie, est en général peu répandu dans le règne végétal. Chez les Basidiomycètes cependant, TOUZÉ-SOULET (1964) a rapporté sa présence dans les tissus de Boletus edulis. Signalons par ailleurs que la méthode utilisée ne permet pas de séparer parfaitement la lysine de l'ornithine et de l'histidine, la valine de la méthionine, les leucines de la phénylalanine.

Enfin, trois spots, désignés par A, B, C, ne sont identifiables à aucun acide aminé ''courant''. Ils sont détruits par hydrolyse et sont vraisemblablement de nature peptidique. Dans le but de vérifier cette hypothèse, j'ai tenté de les obtenir à l'état pur par chromatographie en bande sur papier Whatman n° 3.

Les faibles teneurs en A et B n'ont pas permis d'aboutir à des résultats positifs. La figure 4 schématise la technique suivie pour isoler le composé C. A la suite d'une première migration, pendant 30 heures, dans le solvant n-butanol-acide acétique-eau, on découpe la bande correspondant à la substance C et dans laquelle se situe également une partie de l'asparagine et des aminoacides basiques. Cette bande est éluée par quatre traitements successifs à l'éthanol à 60° GL et un à l'eau distillée. L'éluat est concentré par distillation sous pression réduite et chromatographié dans le solvant phénol-eau. Cette seconde migration permet de séparer C dont l'élution est réalisée ainsi qu'il a été décrit précédemment. Son hydrolyse en milieu acide chlorhydrique 6 N nécessite, pour être complète, un séjour de 48 heures à 105° C. Elle libère de l'acide aspartique, de l'acide glutamique et de l'α-alanine. Aucune tentative n'a été effectuée pour déterminer la structure exacte de ce peptide dont on doit en outre signaler la présence dans le mycélium d'Agaricus bisporus cultivé in vitro, sur milieu semi-synthétique (PIQUEMAL, 1970).

2 - Acides aminés libres.

Les résultats de la détermination quantitative des acides aminés sont rassemblés dans le tableau VI. Ils sont exprimés, pour chaque constituant, en micromoles par gramme de matériel sec et en % par rapport à l'ensemble des substances dosées.

TABLEAU VI

Evolution des teneurs en acides aminés libres

Acides aminés	1ère volée		2ème volée		3ème volée		4ème volée		5ème volée	
	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %
Ornithine	73,1	12,6	55,2	7,7	52,7	5,6	60,0	7,3	47,8	6,9
Lysine	62,9	10,8	61,5	8,6	56,5	6,0	51,2	6,2	48,1	7,0
Arginine	21,1	3,6	38,0	5,3	103,9	11,0	67,3	8,3	46,6	6,8
Acide aspartique	60,2	10,3	84,0	11,7	69,5	7,4	68,0	8,3	54,2	7,8
'' glutamique	151,8	26,2	153,6	21,4	146,7	15,6	154,8	18,9	133,6	19,4
Glycocolle	18,7	3,2	24,0	3,3	26,7	2,8	22,9	2,8	14,9	2,2
α-Alanine	62,9	10,8	96,8	13,5	73,0	7,8	60,5	7,5	53,8	7,8
β-Alanine	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Acide γ-aminobutyrique	7,7	1,3	8,8	1,2	19,4	2,0	19,1	2,3	13,6	2,0
Valine	5,6	0,9	14,4	2,0	9,1	1,0	6,6	0,8	5,4	0,8
Leucine	4,1	0,7	8,5	1,2	8,3	0,9	6,9	0,8	4,0	0,6
Isoleucine	2,9	0,5	5,6	0,8	7,4	0,8	6,2	0,7	3,7	0,5
Sérine	18,1	3,1	23,2	3,2	35,4	3,8	21,3	2,6	17,1	2,5
Thréonine	10,1	1,7	16,8	2,3	24,1	2,6	13,0	1,6	14,4	2,1
Histidine	4,1	0,7	6,1	0,8	5,2	0,6	5,5	0,7	3,8	0,5
Proline	58,6	10,1	91,4	12,8	275,1	29,2	225,9	27,6	211,5	30,6
Tryptophane	+	-	0	-	0	-	0	-	0	-
Méthionine	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Méthionine sulfoxide	13,2	2,3	13,3	1,8	11,4	1,2	25,2	3,1	14,8	2,2
Cystine	2,4	0,4	4,2	0,6	4,3	0,4	+	-	+	-
Cystathionine	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Tyrosine	1,5	0,3	4,8	0,7	5,0	0,5	+	-	+	-
Phénylalanine	2,7	0,5	7,8	1,1	7,0	0,8	4,0	0,5	2,3	0,3
Totaux	581,7	100,0	718,0	100,0	940,7	100,0	818,4	100,0	689,6	100,0
N acides aminés :										
en % de l'N soluble	38,2		45,1		42,8		45,7		34,4	
en μMN_2	395,8		482,55		688,15		571,25		466,45	

L'azote des acides aminés représente entre 34 et 46 % de l'azote soluble. Les valeurs les plus élevées correspondent aux carpophores de deuxième, troisième et quatrième volées.

Les aminoacides les plus fortement représentés à l'état libre sont l'acide glutamique, la proline, la lysine, l'ornithine, l'arginine, l'acide aspartique et l'α-alanine. La β-alanine, la cystathionine, la méthionine, et, dans certains cas, la tyrosine et la cystine ont été décelées en trop faibles quantités pour pouvoir être dosées. La méthionine-sulfoxide provient vraisemblablement de l'oxydation de la méthionine au cours de l'extraction et du passage sur résine échangeuse d'ions. Une telle transformation, signalée par PIKKARAINEN et KULONEN (1959), a été confirmé par TOUZE-SOULET (1964).

Les résultats envisagés en fonction du phénomène des volées appellent quelques remarques.

a - Les champignons de troisième volée sont les plus riches en aminoacides solubles (940,7 µM par g de tissu sec). On y note essentiellement une accumulation de proline et d'arginine (figure 5).

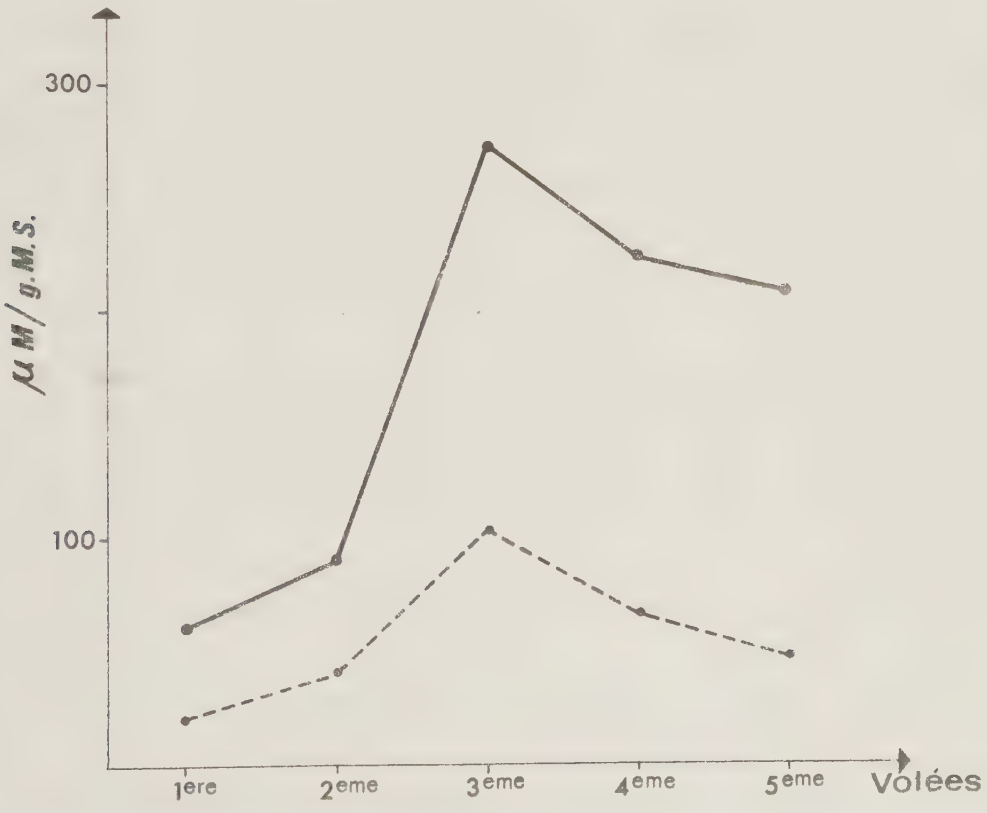


Figure 5 - Variations, en micromoles par g. de matière sèche, des teneurs en arginine ----- et proline ——— .

b - Outre ces deux corps, les composés dont les teneurs présentent, en valeur absolue, les variations les plus importantes sont :

. l'acide aspartique et l'α-alanine (teneurs optimales en deuxième volée),

. la sérine, la thréonine, l'acide γ-aminobutyrique et le glycocolle (teneurs optimales en troisième volée),

. la méthionine sulfoxide (teneur optimale en quatrième volée),

. la lysine et surtout l'ornithine dont les quantités diminuent en fonction du temps de culture. Cette dernière constatation est à mettre en parallèle avec l'augmentation concomitante de l'arginine, dont l'ornithine constitue le précurseur.

c - L'examen des proportions relatives de chacun des constituants fait ressortir la place importante prise par l'arginine et la proline dans les trois dernières volées, alors que le taux d'acide glutamique baisse, essentiellement dans les carpophores de troisième volée.

La méthode de dosage à l' ''amino acid analyzer Beckman'' ne permet pas d'envisager les cas de l'acide α-aminoadipique et du peptide acide aspartique-acide glutamique-alanine. L'évolution de ces composés a été suivie par la technique de BISERTE et coll. (1960) et j'ai pu montrer qu'ils étaient présents en plus grande quantité dans les trois premières volées. La citrulline, enfin, est toujours décelée à l'état de traces.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux, exposés précédemment, de HUGHES et RHODES quant aux variations des teneurs en ornithine, tyrosine et phénylalanine, et ceux de KISSMEYER-NIELSEN et coll. en ce qui concerne l'accumulation de proline. En revanche, j'ai abouti pour d'autres composés à des conclusions différentes. Ceci pourrait laisser supposer que certaines particularités sont inhérentes au matériel végétal utilisé. J'ai retenu dans cette optique deux nouvelles souches de champignon cultivé, les variétés 87 A et 500 Somycel et déterminé, en fonction des volées, les acides aminés libres des carpophores, récoltés au stade II.

Les résultats sont exposés dans le tableau VII. Seules y figurent, en %, les principales différences de teneurs enregistrées dans les deuxième et troisième volées, par rapport aux champignons de première volée pris comme référence.

TABLEAU VII

Carpophores, variétés 87 A et 500 Somycel : Variations en % des teneurs en acides aminés libres au cours des différentes volées (Les valeurs correspondantes, dans le cas de la variété C 63, Le Lion, sont données à titre de comparaison)

Acides aminés	Variété 87 A Somycel		Variété 500 Somycel		Variété C 63 Le Lion	
	2ème volée	3ème volée	2ème volée	3ème volée	2ème volée	3ème volée
Ornithine	- 20	- 41	- 25	- 46	- 25	- 28
Lysine	- 10	- 12	- 15	- 12	- 2	- 10
Arginine	+ 60	+ 183	+ 80	+ 125	+ 80	+ 392
Acide aspartique	+ 22	+ 18	+ 24	+ 20	+ 40	+ 12
'' glutamique	- 10	- 25	- 5	- 10	- 1	- 4
Glycocolle	+ 5	+ 12	+ 5	+ 16	+ 28	+ 43
α-Alanine	+ 40	+ 31	+ 36	+ 28	+ 54	+ 16
Acide γ-aminobutyrique	+ 10	+ 70	+ 10	+ 21	+ 15	+ 152
Proline	+ 60	+ 201	+ 72	+ 190	+ 56	+ 369

On constate dans les bilans en aminoacides solubles des carpophores 87 A et 500 Somycel, une évolution analogue en fonction du temps de culture. Toutefois, l'amplitude des variations est en général supérieure dans le cas de la variété C 63 Le Lion, qui, de ce fait, a été adoptée dans la suite de ce travail comme matériel d'étude.

3 - Amides libres : asparagine, glutamine, urée.

Les amides libres (Tableau VIII) existent toujours en quantités notables.

Leur répartition dans les carpophores des poussées successives diffère de celle des acides aminés libres. Leur concentration est maximale en deuxième et quatrième volées, où l'azote des amides représente respectivement 48,1 % et 42,5 % de l'azote soluble.

TABLEAU VIII

Evolution des teneurs en amides libres

	Asparagine + glutamine		Urée	
	en µM/g de matériel sec	N en % de l'N soluble	en µM/g de matériel sec	N en % de l'N soluble
lère volée	125,5	12,1	97,6	9,4
2ème volée	241,6	22,5	273,7	25,6
3ème volée	206,2	12,8	177,7	11,1
4ème volée	305,5	24,4	225,7	18,1
5ème volée	202,1	14,9	252,4	18,6

L'accumulation d'urée dans les champignons de deuxième volée avait également été signalée par KISSMEYER-NIELSEN, Mc CLENDON et WOODMANSEE (1966). En ce qui concerne l'asparagine et la glutamine, dosées globalement, des séparations par chromatographie sur papier ont montré que la glutamine était toujours plus fortement représentée que l'asparagine.

III- ACIDES AMINES DE LA FRACTION INSOLUBLE.

La composition de la fraction insoluble, déterminée après hydrolyse acide, figure dans le tableau IX. La troisième volée (1868, 4 micromoles d'acides aminés par g. de matériel sec) est la plus riche et viennent ensuite classées en ordre décroissant, les quatrième, deuxième, cinquième et première volées. Ces résultats prouvent que le taux de synthèse protéique subit, en fonction du temps de culture, des modifications sensibles.

Il m'a paru intéressant de vérifier que les macromolécules azotées insolubles avaient une composition identique dans les carpophores des différentes volées. L'examen du tableau IX, dans lequel les teneurs en acides aminés ont été exprimées en micromoles par millimole d'azote insoluble, conduit à conclure positivement.

Ces données font également apparaître la place relativement importante qu'occupent, dans les protéines, l'histidine, le glycocolle, la thréonine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine et la tyrosine, composés qui ne consti-

TABLEAU IX

Acides aminés de la fraction insoluble

	1ère volée		2ème volée		3ème volée		4ème volée		5ème volée	
Acides aminés en µMoles/g de matériel sec	1238,6		1572,7		1868,4		1649,3		1389,1	
Acides aminés par millimole d'azote insoluble	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %
Lysine	94,0	6,4	92,5	6,3	94,9	6,5	93,6	6,4	92,9	6,4
Arginine	65,2	4,5	63,1	4,4	65,5	4,5	64,0	4,4	63,7	4,4
Acide aspartique	156,2	10,7	155,5	10,7	156,3	10,8	155,5	10,8	155,5	10,8
'' glutamique	189,4	12,9	188,2	12,9	183,7	12,7	188,4	13,0	186,4	12,9
Glycocolle	151,7	10,4	151,6	10,4	145,2	10,0	151,5	10,5	150,7	10,4
α-Alanine	128,4	8,8	128,8	8,9	130,0	9,0	128,3	8,8	128,3	8,9
Valine	96,6	6,6	95,6	6,6	95,4	6,6	95,6	6,6	95,6	6,6
Leucine	129,7	8,9	130,1	8,9	128,8	8,9	129,7	8,9	128,7	8,9
Isoleucine	83,5	5,7	82,7	5,7	82,8	5,7	82,1	5,6	83,3	5,8
Sérine	60,3	4,2	60,1	4,1	60,7	4,2	59,5	4,1	59,8	4,1
Thréonine	74,7	5,1	74,5	5,1	75,4	5,2	73,9	5,1	74,2	5,1
Histidine	30,9	2,1	30,5	2,1	31,3	2,2	30,4	2,1	30,2	2,1
Proline	90,0	6,2	90,9	6,3	89,4	6,2	89,3	6,2	88,3	6,1
Tryptophane	7,6	0,5	7,5	0,5	7,5	0,5	7,0	0,5	6,8	0,5
Méthionine	13,4	0,9	16,4	1,1	14,5	1,0	13,3	0,9	13,0	0,9
Cystine	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Tyrosine	26,5	1,8	25,3	1,7	25,3	1,7	26,3	1,8	25,3	1,8
Phénylalanine	63,3	4,3	63,2	4,3	62,8	4,3	63,2	4,3	62,3	4,3
Total	1461,4	100,0	1456,5	100,0	1449,5	100,0	1451,6	100,0	1445,0	100,0
N acides aminés	910,2		903,4		905,5		902,5		898,1	

tuent qu'une faible part des acides aminés libres. L'asparagine et la glutamine n'ont pas été mises en évidence ; si elles existent, elles sont en effet transformées en acides aspartique et glutamique au cours de l'hydrolyse. Ce fait pourrait expliquer en partie les fortes proportions de ces deux acides. Les concentrations en acides aminés soufrés sont toujours faibles. La même remarque s'applique au tryptophane. Ce dernier composé est partiellement détruit dans les conditions d'hydrolyse acide des protéines et SANGER (1952), à la suite des travaux de LUGG (1938) et BRAND et KASSELL (1939), préconise pour son étude l'emploi d'une méthode d'hydrolyse alcaline. Un tel essai (NaOH 2 N, 105° C, 48 heures) n'a pas conduit à la mise en évidence,dans la fraction insoluble d'Agaricus bisporus,de quantités notables de tryptophane. Ces résultats sont en accord avec ceux de FITZPATRICK, ESSELEN et WEIR (1946) et DELMAS et POITOU (1965).

On constate enfin que le total des acides aminés dosés correspond à 90 % de l'azote insoluble : le reste pourrait être attribué à l'azote contenu dans les acides nucléiques et également dans la chitine, caractérisée dans les parois des cellules d'Agaricus.

D - EVOLUTION DES ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES EN FONCTION DE LA CROISSANCE DU CARPOPHORE - LEUR REPARTITION DANS LES DIFFERENTES PARTIES DU CHAMPIGNON.

Les variations des teneurs en acides aminés et amides libres, enregistrées en fonction du phénomène des volées, apparaissent-elles dès la formation des carpophores et subsistent-elles tout au long de leur développement ? Sont-elles localisées dans le stipe, le tissu stérile du chapeau, l'hyménium, ou la répartition des constituants azotés solubles est-elle uniforme dans les différentes parties du champignon ?

Pour répondre à ces questions, j'ai comparé la composition des carpophores de première et troisième volées, récoltés aux stades définis pages 8 à 10.

I - ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES EN FONCTION DE LA CROISSANCE DU CARPOPHORE.

1 - Acides aminés.

Les résultats sont réunis dans le tableau X, complété par le tableau XI. Les acides aminés y ont été rangés par familles ou groupes, les membres de chaque groupe ayant une origine commune ou des relations métaboliques étroites (DAVIES, GIOVANELLI et AP REES, 1964). L'analyse des données acquises amène aux constatations suivantes.

a - En fonction de la croissance des fructifications, la richesse en constituants azotés solubles de 10 individus augmente nettement du stade I au stade II. Par contre, elle décroît légèrement au stade III, malgré la taille et la masse beaucoup plus élevées des échantillons récoltés à ce dernier stade (voir pages 8 et 9).

- L'expression des résultats par rapport à 1 g. de substance sèche explique le fait précédent : les champignons âgés se caractérisent par une chute marquée et générale des teneurs en aminoacides libres. Plusieurs hypothèses peuvent justifier ce fait : utilisation massive de ces composés au cours de la formation des basidiospores, arrêt des processus de synthèse, diminution des transferts de substances solubles du mycélium au carpophore, accélération des réactions cataboliques.

- L'acide glutamique est dans tous les cas prépondérant : il représente en moyenne 22 % du total des acides aminés.

- Les proportions relatives de proline, d'arginine et, à un degré moindre,

TABLEAU X

Acides aminés et amides libres
en fonction du développement du carpophore

	1ère volée			3ème volée		
	Stade I	Stade II	Stade III	Stade I	Stade II	Stade III
Acides aminés et amides libres de 10 carpophores (en µM)	3660,8	11946,6	10169,3	2999,7	10663,7	9957,3
Acides aminés libres par gramme de matériel sec (en µM)						
Acide glutamique	194,4	136,1	63,3	205,0	177,6	81,7
" γ-aminobutyrique	12,1	14,1	4,1	21,8	14,0	12,9
Proline	64,0	49,7	9,0	173,4	173,4	59,0
Lysine	62,1	46,7	24,0	50,9	45,3	33,7
Ornithine	63,6	77,5	29,8	59,6	64,5	47,0
Arginine	26,0	12,6	3,5	87,0	79,1	14,3
Acide aspartique	50,3	52,9	24,8	63,6	70,6	34,6
Thréonine	11,1	11,4	4,1	16,4	16,9	6,5
Glycocolle	26,1	19,9	8,8	27,6	34,1	12,0
Sérine	24,7	20,5	12,7	22,5	22,5	9,2
α-Alanine	108,9	86,2	27,3	102,3	148,7	37,3
Valine + Leucine + Isoleucine	33,7	26,4	8,3	27,8	32,4	9,6
Acides aminés soufrés	12,3	7,9	5,7	14,7	11,8	5,8
Histidine	4,7	3,1	1,9	5,8	5,2	2,4
Acides aminés aromatiques	11,4	9,3	2,8	7,2	17,9	5,5
Total	705,4	574,3	230,1	885,6	914,0	371,5
Amides libres par gramme de matériel sec (en µM)						
Asparagine + Glutamine	148,5	86,8	38,2	177,2	160,5	54,5
Urée	152,0	147,0	127,6	145,0	177,0	177,6
Total	300,5	233,8	165,8	322,8	237,5	232,1

d'α-alanine, subissent dans les carpophores âgés une baisse parfois sensible alors que celles d'ornithine, de lysine et d'acide aspartique ont tendance à augmenter (tableau XI). La place qui revient aux autres corps dans la composition centésimale reste à peu près constante aux différents stades.

TABLEAU XI

Variations dans la composition centésimale en acides aminés libres

	Acides aminés libres (en %)					
	Proline	Lysine	Ornithine	Arginine	Ac. aspartique	α-alanine
1ère volée						
Stade I	9,1	8,8	9,0	3,7	7,1	15,4
Stade II	8,6	8,1	13,5	2,2	9,2	15,0
Stade III	3,9	10,4	13,0	1,5	10,8	11,9
3ème volée						
Stade I	19,6	5,8	6,7	9,8	7,2	11,6
Stade II	19,0	5,0	7,1	8,7	7,7	16,3
Stade III	15,9	9,1	12,6	3,8	9,3	10,0

b - En fonction du temps de culture, les échantillons de troisième volée se caractérisent à tous les stades par des teneurs plus élevées en acides aminés libres.

- Les accumulations d'arginine et de proline dans les sporophores de troisième volée apparaissent dès le stade I et persistent jusqu'au stade III. Ceci apparaît nettement aussi bien lorsque les teneurs en aminoacides sont rapportées à un gramme de substance sèche (tableau X) que lorsqu'on considère la composition centésimale (tableau XI).

2 - Amides.

La part prise dans la fraction soluble par les amides est maximale au stade ultime de croissance (figure 6). Ce résultat est essentiellement imputable à l'urée qui se maintient à un niveau élevé et sensiblement constant durant toute la vie du carpophore (tableau X). Une telle évolution des teneurs en carbamide

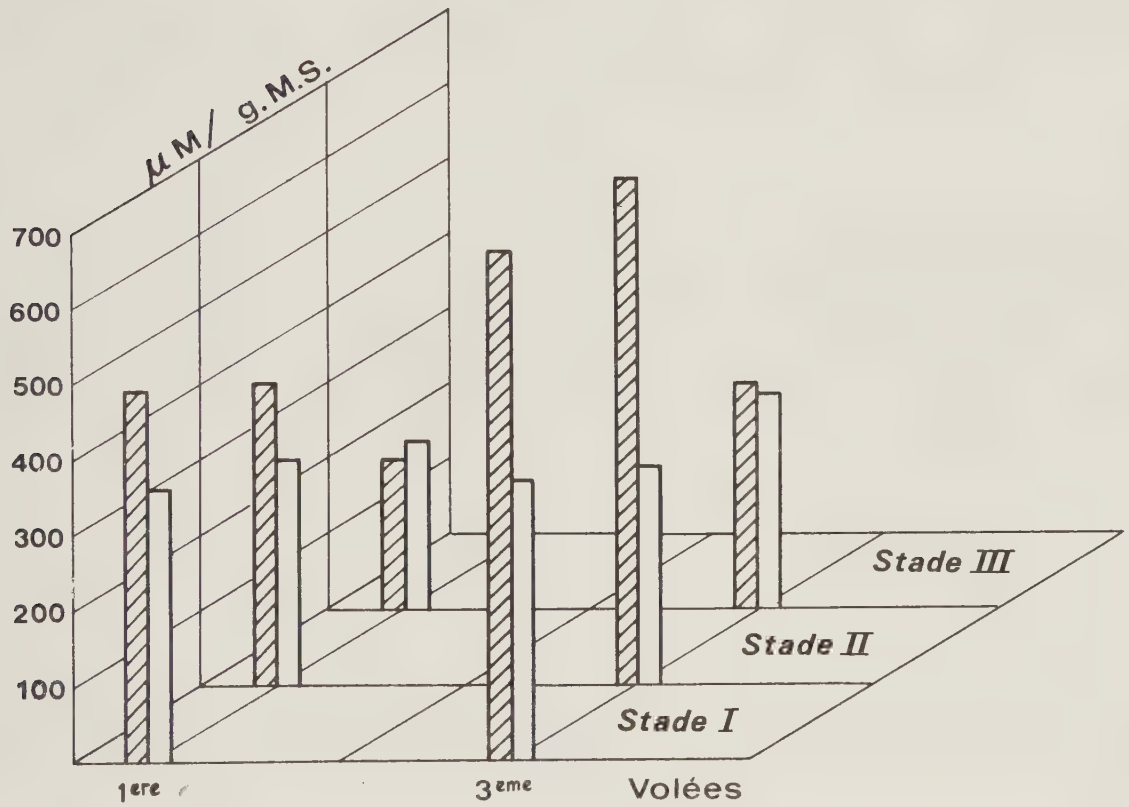


Figure 6 - Evolution, en fonction de la croissance des carpophores, des teneurs en azote des acides aminés ▨ et des amides ▭ (micromoles par g. de matière sèche).

n'est pas entièrement conforme aux constatations faites par IWANOFF (1927). Selon ce auteur, le taux d'urée, faible dans les individus jeunes, augmente avec l'âge pour décroître enfin après formation et dispersion des basidiospores. Il est bon de rappeler cependant que les recherches d'IWANOFF ont été conduites sur le champi-

gnon de pré, Agaricus campestris, et il est possible que l'espèce cultivée se comporte différemment.

II - REPARTITION DES ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES DANS LES DIFFERENTES PARTIES DU CARPOPHORE.

1 - La figure 7 rend compte de la localisation des acides aminés (fig. 7 a) et des amides (fig. 7 b) libres dans les différentes parties du carpophore : stipe, partie stérile du chapeau, hyménium. Au stade I toutefois, l'hyménium est à peine différencié et il n'a pu, de ce fait, être analysé séparément.

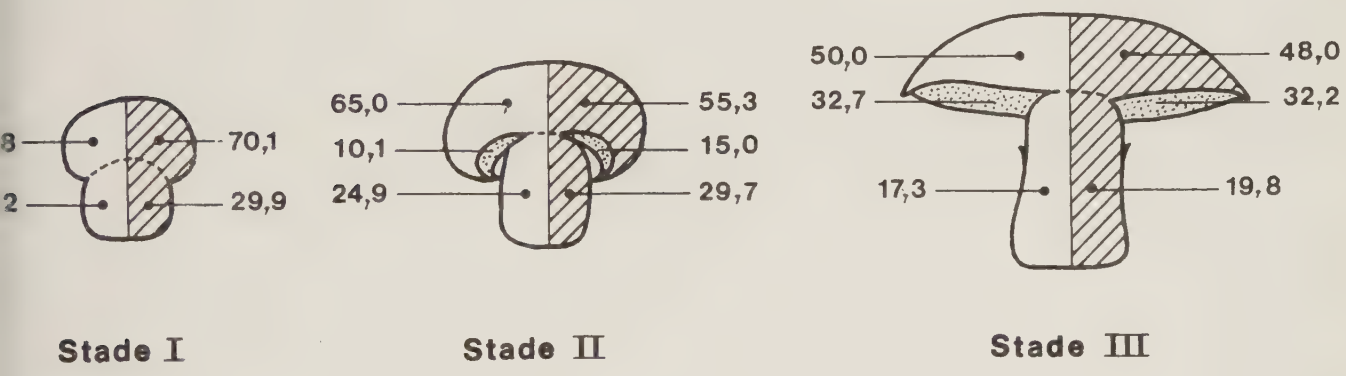


Figure 7 a - Répartition des acides aminés libres (en %) dans les différentes parties du carpophore de 1ere ▭ et 3eme ▨ volées.

On doit noter, au cours de la croissance du champignon, la part de plus en plus importante prise par les lamelles au détriment de la partie stérile du chapeau et surtout du stipe. Outre leur rôle de tissus de transit, stipe et partie stérile du chapeau semblent devoir également jouer, dans la physiologie du carpophore, un rôle de tissus de réserves, ces dernières étant utilisées au fur et à mesure de l'élaboration des basidiospores.

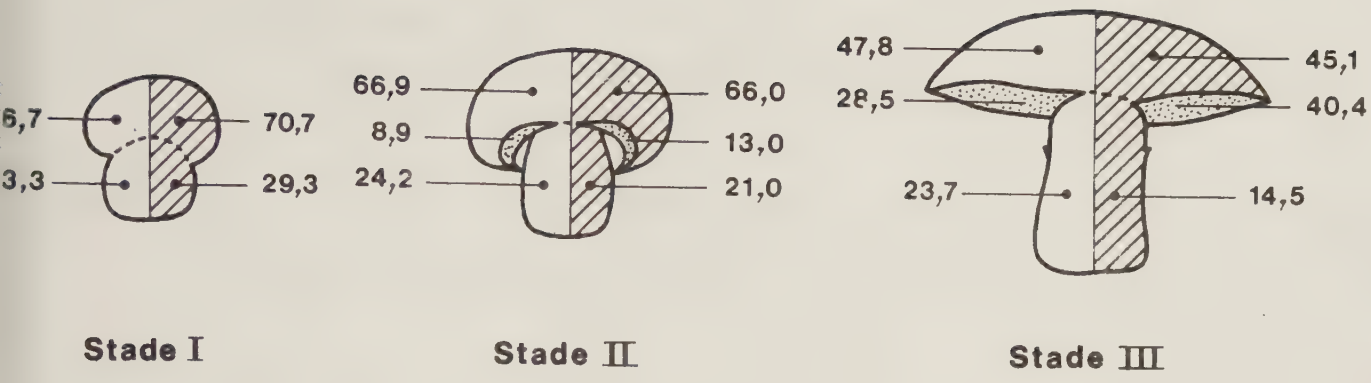


Figure 7 b - Répartition des amides libres (en %) dans les différentes parties du carpophore de 1ere ▭ et 3eme ▨ volées.

Cette remarque s'applique aussi bien aux échantillons de première que de troisieme volées. Dans ce dernier cas cependant, l'hyménium est plus riche en amides, comparativement aux teneurs enregistrées dans les champignons récoltés en début de culture.

2 - Les tableaux XII, XIII et XIV, rassemblent les résultats des dosages des substances azotées solubles aux différents stades de croissance. Les concentrations, exprimées en micromoles par gramme de matière sèche, traduisent la composition intrinsèque de chaque tissu.

a - Stade I (tableau XII).

Le stipe se caractérise par des proportions sensiblement plus élevées en acides aminés basiques et en proline. Respectivement, l'ornithine, l'arginine, la lysine et la proline correspondent en moyenne dans le stipe à 11, 7,7, 8,8 et 17,5

pour cent des aminoacides dosés, contre 6,3, 6, 6,5 et 13 pour cent dans le chapeau. Par contre, les acides aspartique et glutamique, l'α-alanine, l'ensemble valine-leucines, les acides aminés soufrés et aromatiques et, parmi les amides, l'urée, sont, dans le chapeau, plus fortement représentés.

TABLEAU XII

Acides aminés et amides libres des différentes parties du carpophore, stade I.

µM, par g. de substances sèches	1ère volée		3ème volée	
	Stipe	Chapeau	Stipe	Chapeau
Acide glutamique	166,0	212,4	172,1	219,1
'' γ-aminobutyrique	13,2	11,4	19,1	22,6
Proline	70,7	60,0	207,2	158,2
Lysine	73,1	55,9	56,0	48,4
Ornithine	87,1	49,7	76,6	52,1
Arginine	26,8	25,6	98,5	76,2
Acide aspartique	36,0	59,2	57,3	66,2
Thréonine	8,8	12,7	12,4	18,0
Glycocolle	22,8	27,4	21,7	30,2
Sérine	21,9	26,1	25,0	21,3
α-Alanine	94,5	116,4	83,7	110,4
Valine + Leucine + Isoleucine	19,2	42,2	16,4	32,5
Acides aminés soufrés	10,0	16,2	8,9	14,5
Histidine	2,6	6,0	3,1	6,8
Acides aminés aromatiques	4,9	15,2	2,2	8,3
Asparagine + glutamine	138,1	154,4	198,8	167,2
Urée	117,0	142,0	110,0	160,0
N acides aminés (en µM)	451,7	465,4	647,3	613,8
N amides (en µM)	255,1	296,4	208,8	327,2
Acides aminés et amides libres de 10 échantillons (en µM)	1241,3	2422,6	894,1	2094,5

b - Stade II (tableau XIII).

Les différences entre le stipe et la partie stérile du chapeau déjà signalées au stade précédent * se maintiennent, surtout en troisième volée, en ce qui concerne la proline, l'arginine, la lysine, l'α-alanine, la valine et les leucines, les acides aminés aromatiques. L'hyménium, riche en proline, acides glutami-

TABLEAU XIII

Acides aminés et amides libres des différentes parties du carpophore, stade II.

µM, par g. de substance sèche	1ère volée			3ème volée		
	Stipe	Tissu stérile du chapeau	Hyménium	Stipe	Tissu stérile du chapeau	Hyménium
Acide glutamique	77,4	163,6	144,2	181,2	159,8	239,4
'' γ-aminobutyrique	11,0	15,3	15,4	14,8	13,3	15,0
Proline	49,3	48,1	58,0	226,5	140,1	210,2
Lysine	65,8	43,3	20,6	59,3	40,3	40,0
Ornithine	75,4	90,6	25,7	81,2	66,7	40,0
Arginine	15,6	13,7	2,0	127,6	67,2	22,8
Acide aspartique	49,1	56,1	46,6	66,0	60,3	120,0
Thréonine	10,7	11,7	7,1	14,6	17,9	16,7
Glycocolle	16,6	23,3	11,8	28,0	39,8	24,6
Sérine	21,3	21,2	15,2	24,2	27,3	15,6
α-Alanine	67,5	101,7	60,2	151,0	149,4	143,7
Valine + Leucine + Isoleucine	21,5	32,6	10,5	21,1	41,7	18,3
Acides aminés soufrés	9,2	10,2	7,8	12,8	10,8	14,5
Histidine	2,9	3,9	+	3,0	7,1	1,6
Acides aminés aromatiques	4,7	12,4	5,1	10,6	23,2	9,7
Asparagine + Glutamine	67,4	103,7	55,3	153,8	179,8	95,3
Urée	129,0	167,0	100,0	112,0	200,0	203,0
N acides aminés (en µM)	345,9	415,3	241,3	775,6	593,9	541,9
N amides (en µM)	196,4	270,7	155,3	265,8	379,8	298,3
Acides aminés et amides libres de 10 échantillons (en µM)	2956,1	7845,5	1164,5	2906,5	6184,4	1538,9

* L'échantillon ''chapeau entier'' du stade I est assimilé à l'échantillon ''partie stérile du chapeau'' des autres stades de développement. La part minime qui revient à l'hyménium dans les très jeunes carpophores justifie cette approximation.

que et aspartique, est pauvre en aminoacides basiques. Des résultats semblables avaient été obtenus antérieurement à partir d'une variété indéterminée de champignons du commerce (LATCHE, 1963).

Les amides constituent, pour la partie stérile du chapeau, une plus grande fraction des substances azotées solubles mais on doit signaler toutefois l'importance des teneurs en urée dans les lamelles des carpophores de troisième volée.

c - Stade III (tableau XIV).

TABLEAU XIV

Acides aminés et amides libres des différentes parties du carpophore, stade III.

µM par g. de substance sèche	1ère volée			3ème volée		
	Stipe	Tissu stérile du chapeau	Hyménium	Stipe	Tissu stérile du chapeau	Hyménium
Acide glutamique	37,0	54,6	95,0	50,7	77,2	103,0
" γ-aminobutyrique	3,1	3,0	6,1	47,5	4,8	3,3
Proline	9,5	10,7	6,5	59,6	55,8	62,0
Lysine	119,6	39,0	8,2	38,9	50,2	12,6
Ornithine	26,1	49,0	8,0	55,9	72,5	14,0
Arginine	2,5	6,5	0,4	14,9	26,1	0,8
Acide aspartique	14,9	29,9	26,0	22,3	38,1	37,1
Thréonine	2,5	5,2	4,0	5,8	8,0	5,1
Glycocolle	5,7	11,0	8,2	9,1	14,9	10,3
Sérine	7,5	14,2	14,8	10,7	16,2	16,7
α-Alanine	16,5	22,3	31,2	28,3	41,7	37,1
Valine + Leucine + Isoleucine	5,0	9,9	8,8	9,8	9,7	9,1
Acides aminés soufrés	3,3	8,0	6,4	6,1	6,6	4,2
Histidine	1,1	3,9	+	2,4	4,5	+
Acides aminés aromatiques	1,7	3,1	3,7	2,7	3,4	9,1
Asparagine + Glutamine	13,9	53,4	37,3	35,8	73,5	43,9
Urée	142,0	135,0	107,0	128,0	175,0	207,0
N acides aminés (en µM)	105,7	192,8	122,4	254,5	319,9	176,7
N amides (en µM)	155,9	188,4	144,3	163,8	248,5	250,9
Acides aminés et amides libres de 10 échantillons (en µM)	2037,9	4995,9	3149,2	1771,8	4671,8	3522,4

Quantitativement, tous les composés dosés diminuent considérablement par rapport au stade II. Les proportions relatives des différents aminoacides du stipe et de la partie stérile du chapeau ont tendance à s'égaliser, sauf en ce qui concerne la proline. Dans l'hyménium, l'acide glutamique représente plus du tiers du total des acides aminés, l'acide aspartique et l'alanine existant également en quantité notable ; on note en outre, en troisième volée, de fortes concentrations en proline et en urée.

Quelques-unes des constatations précédentes, relatives aux principaux composés de la famille de l'acide glutamique dont le métabolisme fait l'objet d'une étude ultérieure, sont illustrées dans la figure 9. La figure 8 est consacrée aux amides.

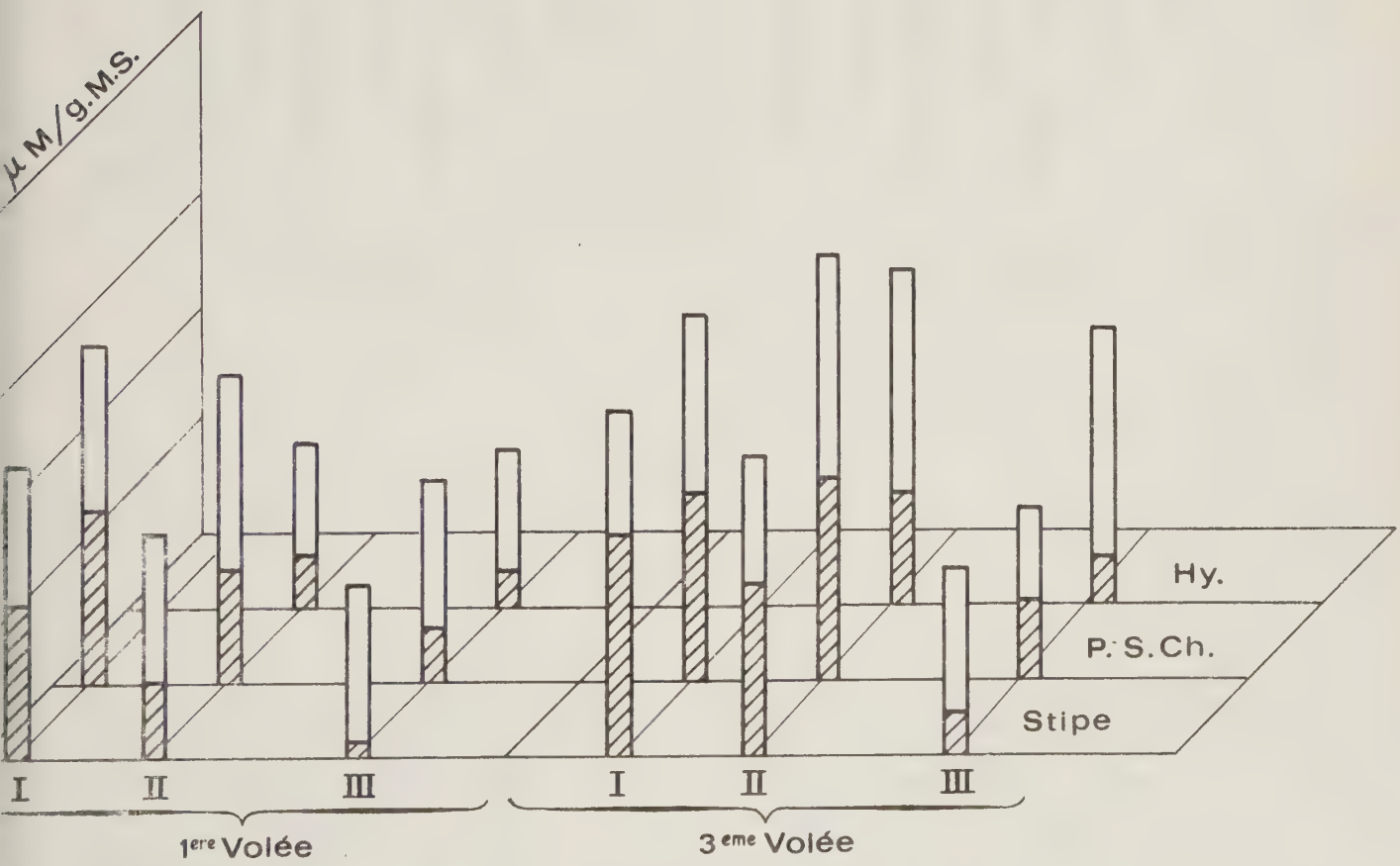


Figure 8 - Evolution des teneurs en amides (glutamine + asparagine ▨, urée ▭) dans les différentes parties du carpophore (en micromoles par g. de matière sèche).

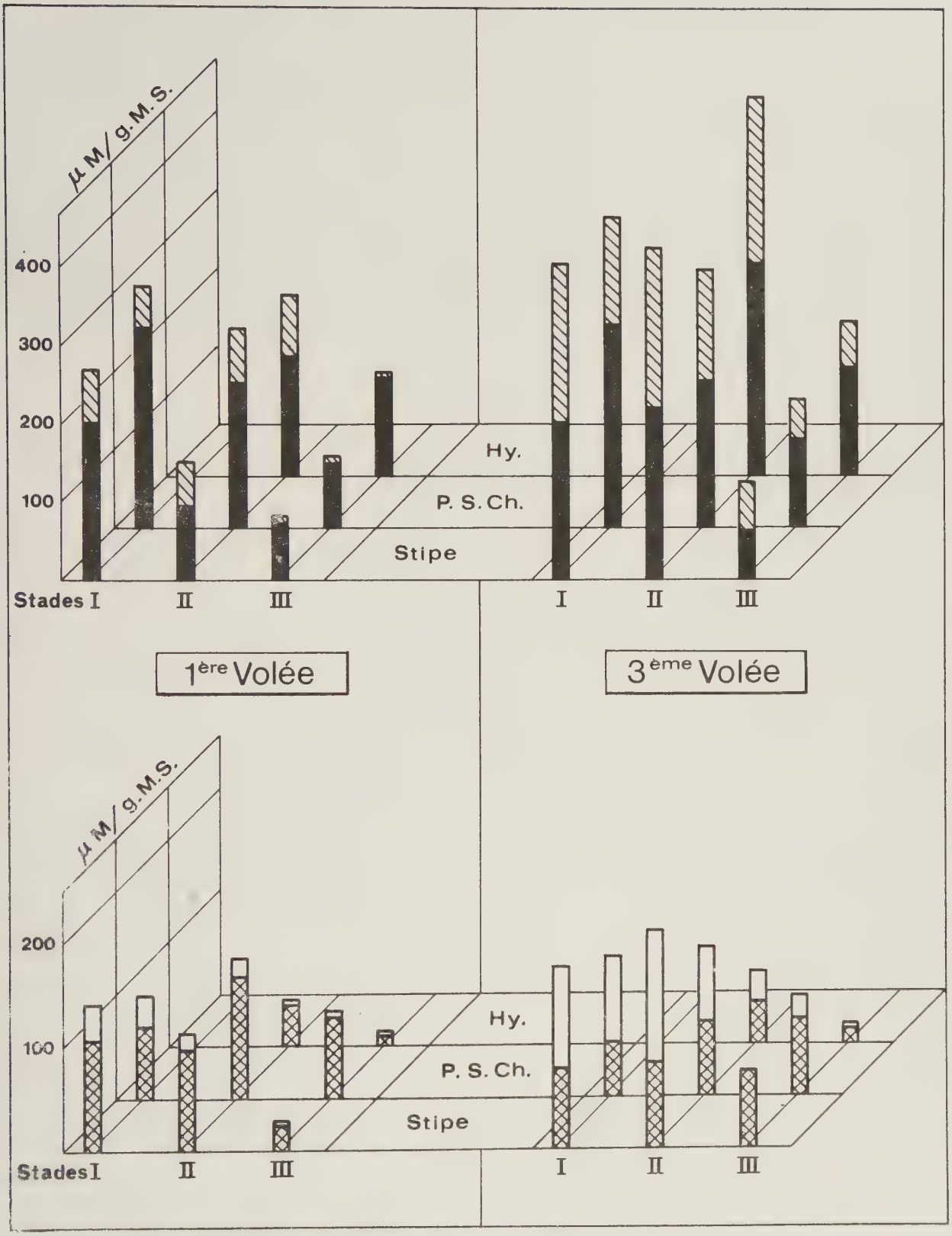


Figure 9 - Evolution des teneurs en acide glutamique ▬, proline ▨, ornithine ▩ et arginine ▭ dans les différentes parties du carpophore (en micromoles par g. de matière sèche).

Les cas enfin de l'acide α-aminoadipique et du peptide acide aspartique-acide glutamique-alanine, non dosables à l' ''Amino acid analyzer Beckman'' ont été examinés séparément. Les différentes parties du champignon renferment des quantités sensiblement égales du peptide acide aspartique-acide glutamique-alanine. Le taux d'acide α-aminoadipique, présent à l'état de traces dans l'hyménium, est plus important dans le stipe et dans la partie stérile du chapeau. Son évolution en fonction de la croissance du carpophore est parallèle à celle de la lysine. Ceci est à rapprocher du fait que des relations métaboliques étroites existent, chez les Basidiomycètes, entre ces deux composés (VOGEL, 1964).

E - CONCLUSIONS.

Le tableau XV donne une vue d'ensemble sur la composition en acides aminés totaux (acides aminés libres + acides aminés de la fraction insoluble) des carpophores d'Agaricus bisporus. On constate que l'acide glutamique, la proline, l'acide aspartique, la lysine, le glycocolle, l'α-alanine, la valine et les leucines occupent dans ce bilan une place privilégiée.

TABLEAU XV

Acides aminés totaux des carpophores d'Agaricus bisporus, Stade II.
(en micromoles par g. de tissu sec)

	lère volée	2ème volée	3ème volée	4ème volée	5ème volée
Acide glutamique	312,3	357,3	383,9	368,8	312,8
" γ-aminobutyrique	7,7	8,8	19,4	19,1	13,6
Proline	134,9	189,8	390,4	327,3	296,4
Lysine	142,6	161,6	179,0	157,6	137,4
Ornithine	73,1	55,2	52,7	60,0	47,8
Arginine	76,4	106,3	188,5	140,0	107,9
Acide aspartique	192,6	252,3	271,3	244,7	203,7
Thréonine	73,5	97,4	121,4	97,0	85,8
Glycocolle	147,3	188,0	214,1	195,1	159,8
Sérine	69,2	88,3	113,7	88,9	74,5
α-Alanine	171,7	236,1	240,7	206,3	177,2
Valine + Leucine + Isoleucine	275,1	362,1	420,8	368,8	308,8
Acides aminés soufrés	26,9	31,9	32,1	40,3	27,3
Histidine	30,3	39,1	45,7	40,1	32,8
Acides aminés aromatiques	86,6	116,4	135,4	113,7	93,0
Total	1820,2	2290,6	2809,1	2467,7	2078,8

Il convient de souligner l'importance de l'acide glutamique, qui constitue en moyenne le cinquième des aminoacides libres : ceci plaiderait en faveur d'une participation active de ce corps au métabolisme intermédiaire du champignon

de couche. Certains composés sont en revanche très peu représentés dans la fraction soluble et leur synthèse dans le carpophore, ou leur absorption à partir du milieu nutritif, doit être immédiatement suivie de leur incorporation dans les protéines. Cette remarque s'applique plus spécialement à la sérine, la thréonine, la valine, la leucine, l'isoleucine, l'histidine, les acides aminés soufrés et aromatiques. Par ailleurs, je n'ai jamais décelé l'existence des deux dérivés de l'acide glutamique, agaritine et L (+)-γ (p-hydroxy) anilide, respectivement mentionnés dans les champignons du genre Agaricus par LEVENBERG (1961, 1964) et par JADOT, CASIMIR et RENARD (1960).

L'étude en fonction de la croissance des fructifications a permis de mettre en évidence dans les premiers stades des teneurs élevées en constituants azotés solubles. Au contraire, après formation des basidiospores, on observe une nette diminution de toutes les substances dosées, exception faite de l'urée. La carbamide se maintient toujours à un niveau sensiblement constant et elle constitue de ce fait, dans les échantillons âgés, le composé azoté soluble prépondérant.

Il est intéressant de noter que le stipe, la partie stérile du chapeau et l'hyménium n'ont pas une composition identique en aminoacides et amides libres. Je mentionnerai à ce propos que des expériences, effectuées en marge de ce travail, ont également permis de démontrer que l'utilisation in vivo de plusieurs métabolites (acides glutamique et γ-aminobutyrique, proline, arginine) présente, dans les diverses parties du carpophore, des variations significatives. Au fur et à mesure de la différenciation des basidiospores, on assiste enfin à un appauvrissement en composés azotés solubles, plus marqué dans les tissus stériles.

L'analyse des carpophores issus des poussées successives d'une même culture conduit à la mise en évidence de différences sensibles dans les taux d'azote soluble et insoluble, les valeurs maximales correspondant aux champignons de troisième volée. Si, comme il était logique de l'espérer, la composition centésimale des protéines en aminoacides est constante dans tous les échantillons, des modifications sont par contre enregistrées en ce qui concerne les constituants solubles. Parmi ces derniers, on remarque essentiellement une accumulation de proline et d'arginine en troisième volée. Les teneurs en ornithine, acide aspartique, alanine, sérine, glycocolle, glutamine, asparagine et urée subissent également des variations

qui, bien que quantitativement moins importantes, méritent cependant d'être signalées. Ces résultats obtenus à partir de la variété C 63, Le Lion, retenue comme matériel d'étude au cours de ce travail, ont été confirmés à partir de deux autres souches, 87 et 500 Somycel.

Il est bien connu que la nature et la concentration de la source d'azote du milieu amènent des différences sensibles dans la composition de la fraction soluble des champignons cultivés in vitro (COCHRANE, 1958). Le champignon de couche n'échappe pas à cette règle (HUMFELD et SUGIHARA, 1952). Des modifications ont également été enregistrées dans les teneurs en aminoacides des carpophores, consécutivement à un enrichissement du compost en composés azotés. DELMAS et POITOU (1965) ont ainsi montré que l'apport d'acide glutamique entraîne une augmentation générale des principaux acides aminés libres des champignons récoltés. Dans le cas du glycocolle, on note une élévation très importante des taux d'acides aspartique et glutamique et d'α-alanine. L'addition d'asparagine enfin ne produit pas une augmentation notable de cette amide dans les carpophores mais elle y provoque par contre une diminution de tous les acides aminés libres. L'introduction de mélanges azotés complexes, tels que gélatine et hydrolysat de caséine, influe également sur la composition des champignons se développant sur ce milieu enrichi (KISSMEYER-NIELSEN, Mc CLENDON et WOODMANSEE, 1966) : les modifications les plus importantes portent sur les teneurs en acide aspartique, acide glutamique, glycocolle, sérine, proline, histidine, arginine et urée.

Il n'est donc pas impossible que les variations dans les bilans en acides aminés et amides libres, puissent s'expliquer par d'éventuels changements survenus dans le milieu nutritif en cours de culture. Le bien-fondé de cette hypothèse sera examiné dans la deuxième partie de ce travail.

DEUXIEME PARTIE

INCIDENCE DE LA COMPOSITION DU COMPOST DE CULTURE SUR LES TENEURS EN ACIDES AMINES LIBRES DES CARPOPHORES D'*Agaricus bisporus*.

A - MATERIEL D'ETUDE ET TECHNIQUES UTILISEES.

I - Matériel d'étude : le compost

II - Méthodes d'extraction et de dosage

1 - Choix de la méthode d'extraction des acides aminés et amides libres.

2 - Dosage des aminoacides libres.

3 - Détermination des acides aminés de la fraction insoluble.

4 - Etude des composés guanidiques.

B - EVOLUTION, EN FONCTION DU TEMPS DE CULTURE, DE QUELQUES CONSTITUANTS AZOTES DU COMPOST.

I - Etude de la fraction azotée soluble.

1 - Acides aminés et amides libres.

2 - Composés guanidiques.

II - Acides aminés de la fraction insoluble.

III - Acides aminés utilisés en fonction du temps de culture.

C - ADDITIONS AU COMPOST D'ELEMENTS NUTRITIFS AZOTES - LEUR REPERCUSSION SUR LA COMPOSITION DES CARPOPHORES.

D - CONCLUSIONS.

INCIDENCE DE LA COMPOSITION DU COMPOST DE CULTURE SUR LES TENEURS EN ACIDES AMINES LIBRES DES CARPOPHORES D'Agaricus bisporus.

A - MATERIEL D'ETUDE ET TECHNIQUES UTILISEES.

La plupart des recherches conduites sur les composts de culture du champignon de couche ont été orientées jusqu'ici vers une meilleure compréhension de la phase préparatoire, aboutissant à l'obtention d'un mélange susceptible d'assurer un rendement maximum. La phase de culture proprement dite, et plus spécialement la détermination des modifications qu'entraînent, dans le milieu, le développement du mycélium et surtout la production de carpophores, ont été moins fréquemment abordées. Le but essentiel de l'étude entreprise ici est de rechercher s'il se produit normalement, en cours de culture, des changements qualitatifs ou quantitatifs en éléments nutritifs azotés du compost, capables d'influer directement sur la composition des carpophores. Je me suis toutefois limité aux acides aminés libres et combinés et aux composés guanidiques, ces derniers pouvant intervenir dans le métabolisme de l'arginine.

I - MATERIEL D'ETUDE : LE COMPOST.

Les prélèvements de compost ont été opérés dans les 2 à 4 jours qui précèdent l'apparition des volées et en fin de culture.

Les stades d'études sont respectivement désignés par A, B, C, D, E, F et la figure 10 permet de les mieux situer par rapport à la production de carpophores. Dans chaque cas, l'échantillon analysé correspond à la somme de 15 prises d'essai effectuées en différents points sur 5 caisses de culture de champignons. Les fragments de terre de gobetage et les plus gros cordons mycéliens sont soigneusement éliminés. Il convient cependant de souligner que, malgré ces précautions, il est impossible de séparer le substratum inerte de la matière vivante qui s'y développe, mycélium d'Agaricus et microorganismes.

Avant extraction, la valeur du pH est mesurée sur une macération résultant du broyage de 5 g de compost frais dans 30 ml d'eau distillée, homogénéisée pendant 15 minutes par agitation et centrifugée. En fonction du temps de culture,

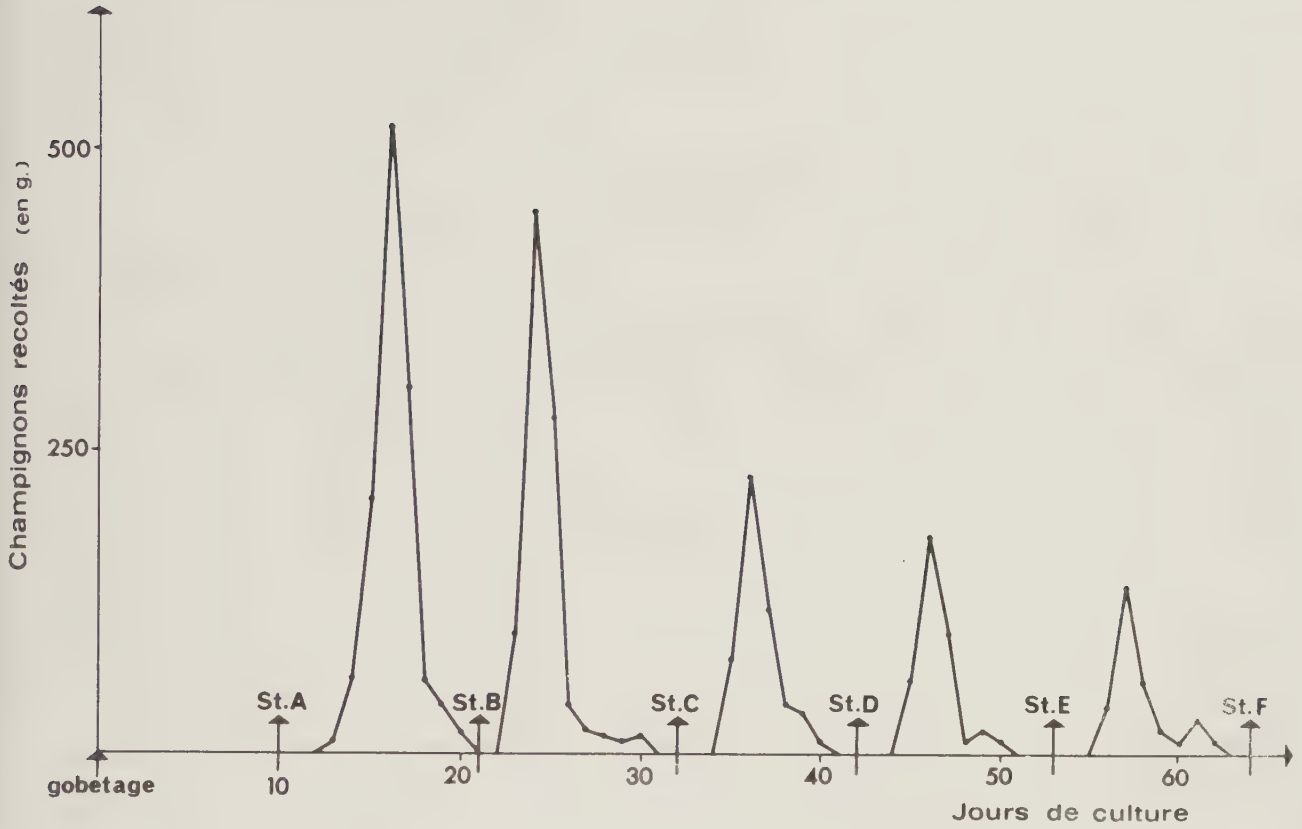


Figure 10 - Stades d'étude du compost : localisation des prélèvements en fonction de la production de carpophores.

le milieu a tendance à s'acidifier de façon régulière, bien que les variations restent faibles : pH 7,1 au stade A, pH 6,5 au stade F.

Le taux de substance sèche est déterminé après dessiccation à 105° C, durant 7 heures. Il varie de 30 % à 41 %, du stade initial au stade final.

II - METHODES D'EXTRACTION ET DE DOSAGE.

1 - Choix de la méthode d'extraction des acides aminés et amides libres.

Au cours d'essais préliminaires, quatre méthodes ont été utilisées à partir de lots homogènes de compost (15 g de matière fraîche) :

- extraction, à basse température, par une solution aqueuse à 10 % d'acide trichloracétique.
- extraction éthanolique à froid.
- extraction par l'eau distillée à chaud, puis par l'acide trichloracétique à 10 %.
- extraction par l'acétate d'ammonium 0,5 M.

Dans tous les cas, le matériel est traité à l'état frais, après fixation par l'azote liquide.

Les deux premières techniques ont été exposées précédemment, à propos de l'étude des composés azotés du carpophore d'Agaricus bisporus (voir pages 17 à 19). Le troisième traitement, décrit par BRUNEL (1949), avait été adopté par DELMAS et DUREAU (1962) pour la séparation de l'azote soluble et insoluble des composts. Le matériel est broyé dans l'eau distillée et la suspension obtenue est portée pendant une heure à 100° C. Après refroidissement, on ajoute un volume égal d'une solution aqueuse à 20 % d'acide trichloracétique et on laisse reposer l'ensemble une nuit au réfrigérateur. La quatrième méthode enfin, comporte trois extractions, de 30 minutes chacune, par une solution d'acétate d'ammonium 0,5 M. Elle a été employée avec succès par PAUL et SCHMIDT (1960) pour l'étude des acides aminés libres des sols. Son choix permettait de vérifier si l'application, au milieu de culture du champignon de couche, d'une méthode assurant dans les sols une bonne récupération des aminoacides, donnait des résultats intéressants. La nature du compost et son état plus finement divisé en fin de culture, après décomposition des pailles, pouvait en effet faire craindre l'existence de phénomènes de fixation des composés organiques de bas poids moléculaires.

Le tableau XVI permet de comparer l'efficacité de ces différents traitements.

TABLEAU XVI

Comparaison de différentes méthodes d'extraction des composés azotés solubles du compost.

Composés solubles en µM/g de matériel sec	Extraction au T.C.A. à 10 % (a)	Extraction éthanolique (b)	Extraction à l'eau distillée à chaud et T.C.A. 10 % (c)	Extraction à l'acétate d'ammonium (d)
Ornithine	22,1	18,4	20,2	28,4
Lysine	38,5	24,5	48,4	42,2
Arginine	30,3	16,0	37,6	42,4
Acide aspartique	42,4	49,3	93,0	21,5
" glutamique	174,5	181,3	244,9	86,5
Glycocolle	25,6	27,0	62,9	27,9
α-Alanine	63,5	66,4	122,0	60,9
Leucine	40,6	41,5	88,3	50,7
Sérine	39,0	38,0	64,5	39,8
Proline	288,6	298,4	301,4	110,8
Glutamine + Asparagine	68,1	68,9	44,1	60,4

Les essais (a) et (b) conduisent à des constatations identiques à celles effectuées à propos de l'extraction des constituants azotés solubles des carpophores d'Agaricus bisporus : meilleure solubilisation des acides aminés basiques en milieu trichloracétique, des acides dicarboxyliques en milieu éthanolique. La technique (c) permet par contre d'obtenir des quantités beaucoup plus importantes d'aminoacides libres. Ceci provient vraisemblablement d'une hydrolyse partielle des amides d'une part, des peptides ou des protéines d'autre part. A l'appui de cette hypothèse, on peut avancer le fait que la teneur en ornithine, substance qui n'entre pas dans la composition des protéines, ne subit aucune augmentation, à l'inverse des autres corps dosés pouvant avoir une origine protéique. Le déficit en acides aspartique et glutamique et en proline, enregistré dans le cas de l'extrac-

tion (d) à l'acétate d'ammonium, proscrit enfin l'utilisation de cette méthode, pourtant satisfaisante par ailleurs.

Ces différents résultats m'ont amené à adopter, pour l'étude des acides aminés et amides libres du compost, le mode d'extraction à froid par l'acide trichloracétique à 10 %. Cette même technique a d'ailleurs été précédemment retenue pour la séparation des fractions azotées soluble et insoluble des carpophores.

2 - Dosage des aminoacides libres.

Il est réalisé à l' ''Amino acid analyzer Beckman''. Les faibles teneurs du milieu en éléments solubles imposent une concentration préalable de l'extrait brut. Après passage du liquide d'extraction sur colonne de Dowex 50, forme H^+ et élution par l'ammoniaque N, puis 2 N, l'éluat est évaporé à sec sous pression réduite, en présence d'une faible quantité d'une solution saturée de carbonate de lithium assurant une élimination complète de l'ammoniaque. Le résidu, correspondant à l'extraction de 15 g. de matière fraîche, est repris par 25 ml de tampon citrate-HCl de pH 2,2 et 4 ml de cette solution sont utilisés pour l'analyse des acides aminés.

3 - Détermination des acides aminés de la fraction insoluble.

Le protocole expérimental retenu pour la détermination des acides aminés de la fraction insoluble est identique à celui décrit page 21 à propos de l'étude du carpophore d'Agaricus bisporus.

4 - Etude des composés guanidiques.

Les composés guanidiques sont extraits, à partir de 10 g de compost frais, par l'éthanol, selon la méthode préconisée par REINBOTHE (1964). Ils sont séparés par chromatographie sur papier Whatman n° 40 à l'aide des deux systèmes de solvants : n-butanol-acide acétique-eau (40 - 10 - 50) et phénol saturé d'eau. Les réactifs de Sakaguchi à l'α-naphtol (ROCHE, THOAI et HATT, 1954), de Jaffe et au diacétyle (SMITH, 1960) ont été utilisés pour la révélation des chromatogrammes.

B - EVOLUTION, EN FONCTION DU TEMPS DE CULTURE, DE QUELQUES CONSTITUANTS AZOTES DU COMPOST.

I - ETUDE DE LA FRACTION AZOTEE SOLUBLE.

1 - Acides aminés et amides libres.

L'examen du tableau XVII met en lumière la place prépondérante qu'occupe

TABLEAU XVII

Composés azotés solubles du compost

Composés dosés pour 100 g de matière sèche	Stade A		Stade B		Stade C		Stade D		Stade E		Stade F	
	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %
Ornithine	21,0	2,4	20,7	2,4	13,6	2,4	14,7	2,3	12,3	2,3	7,3	2,0
Lysine	38,2	4,3	34,3	3,9	17,8	3,1	25,3	4,0	20,8	3,8	14,4	4,0
Arginine	25,4	2,8	16,0	1,8	9,7	1,7	15,7	2,5	10,1	1,8	8,4	2,3
Acide aspartique	48,5	5,4	60,5	6,9	35,7	6,3	34,9	5,5	33,4	6,1	20,1	5,5
'' glutamique	246,2	27,6	226,7	26,0	178,7	31,5	168,5	26,7	144,4	26,4	80,6	22,3
Glycocolle	25,7	2,9	27,4	3,2	19,3	3,4	17,3	2,7	26,3	4,8	8,3	2,3
α-Alanine	68,9	7,7	80,1	9,2	34,3	6,0	49,6	7,9	40,2	7,3	37,4	10,3
Acide γ-aminobutyrique	13,3	1,5	13,1	1,5	9,3	1,6	10,8	1,7	6,9	1,3	5,5	1,5
Valine	20,2	2,3	22,0	2,5	9,4	1,6	15,1	2,4	11,0	2,0	10,2	2,8
Leucine	37,1	4,2	45,9	5,3	17,5	3,1	30,5	4,8	20,4	3,7	23,4	6,4
Isoleucine	13,9	1,5	16,0	1,8	7,4	1,3	9,2	1,5	8,4	1,5	8,4	2,3
Sérine	44,5	5,0	49,3	5,7	28,4	5,0	32,2	5,1	27,5	5,0	17,9	4,9
Thréonine	22,1	2,5	26,8	3,1	17,9	3,2	20,1	3,2	16,6	3,0	12,1	3,3
Histidine	5,8	0,6	5,6	0,6	1,1	0,2	3,0	0,5	3,8	0,7	1,3	0,4
Proline	142,5	16,0	100,1	11,4	94,7	16,6	103,5	16,4	105,8	19,2	54,5	15,0
Tryptophane	+	-	+	-	+	-	0	-	0	-	0	-
Méthionine	15,5	1,7	28,2	3,2	13,7	2,4	13,7	2,2	12,1	2,3	7,2	2,0
'' sulfoxide	55,3	6,2	58,9	6,8	42,1	7,4	39,3	6,2	31,8	5,8	30,3	8,3
'' sulfone	18,6	2,1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Cystine	6,2	0,7	8,5	1,0	1,7	0,3	4,3	0,8	+	-	+	-
Cystathionine	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Tyrosine	5,2	0,5	11,1	1,3	6,8	1,2	5,4	0,9	5,7	1,1	4,4	1,2
Phénylalanine	18,5	2,1	20,6	2,4	9,7	1,7	17,1	2,7	10,7	1,9	11,8	3,2
Totaux :	892,6	100,0	871,8	100,0	568,8	100,0	630,2	100,0	548,2	100,0	363,5	100,0
N acides aminés	522,9		497,3		316,6		363,8		309,6		206,5	
Glutamine + asparagine	68,7		29,7		28,1		63,7		50,5		25,6	

toujours l'acide glutamique dans les bilans en acides aminés libres du milieu. Selon les stades, il représente en effet à lui seul 22 à 30 % de l'ensemble des composés dosés. Une remarque analogue a été effectuée par DELMAS et POITOU (1965). D'après ces mêmes auteurs, la proline, qui existe également en quantité notable, est absente de la fraction soluble des composts jusqu'à l'introduction du ''blanc'' et n'y apparaît qu'après la phase de croissance végétative du mycélium.

La quantité globale des divers constituants décroît en fonction du temps de culture et la diminution la plus marquée est consécutive au développement de la deuxième volée. L'importance de cette dernière pourrait justifier une forte utilisation des éléments nutritifs du milieu.

En aucun cas, une accumulation marquée d'un aminoacide dans le compost n'a été mise en évidence. On note cependant de légères variations dans la composition centésimale. Ainsi la proportion relative de proline passe de 11,4 % au stade B à 16,6 % au stade C, c'est-à-dire avant l'apparition de la troisième volée. Ces faits ne paraissent pas toutefois susceptibles d'expliquer les modifications de composition des carpophores issus des poussées successives.

La part prise par les amides subit, en fonction du temps de culture, d'importants changements. Les valeurs du rapport $\frac{\text{azote des acides aminés}}{\text{azote des amides}}$ sont successivement de 7,6 (Stade A), 16,7 (Stade B), 11,3 (Stade C), 5,7 (Stade D), 6,1 (Stade E) et 8,1 (Stade F). La glutamine existe toujours en plus grande quantité que l'asparagine. J'ai représenté sur la figure 11 l'évolution des teneurs en amides libres, d'une part des carpophores, d'autre part du milieu de culture. Il est extrêmement difficile de tirer de ces résultats une conclusion précise. On peut seulement souligner que les variations des concentrations en glutamine et asparagine, dans les carpophores de troisième, quatrième et cinquième volées et dans le compost aux stades correspondants, sont sensiblement parallèles.

2 - Composés guanidiques.

L'étude des composés guanidiques a permis de mettre en évidence aux stades D, E et F, l'apparition d'un composé réagissant positivement à la réaction au diacétyle et ne se révélant pas aux réactifs de Sakaguchi et de Jaffe. Par cochromatographie dans plusieurs mélanges solvants (THOAI, HATT et TRAN THI AN, 1956), ce corps a été identifié comme étant la créatine, composé jamais signalé, à ma connaissance, comme une possible source d'azote pour le champignon de couche.

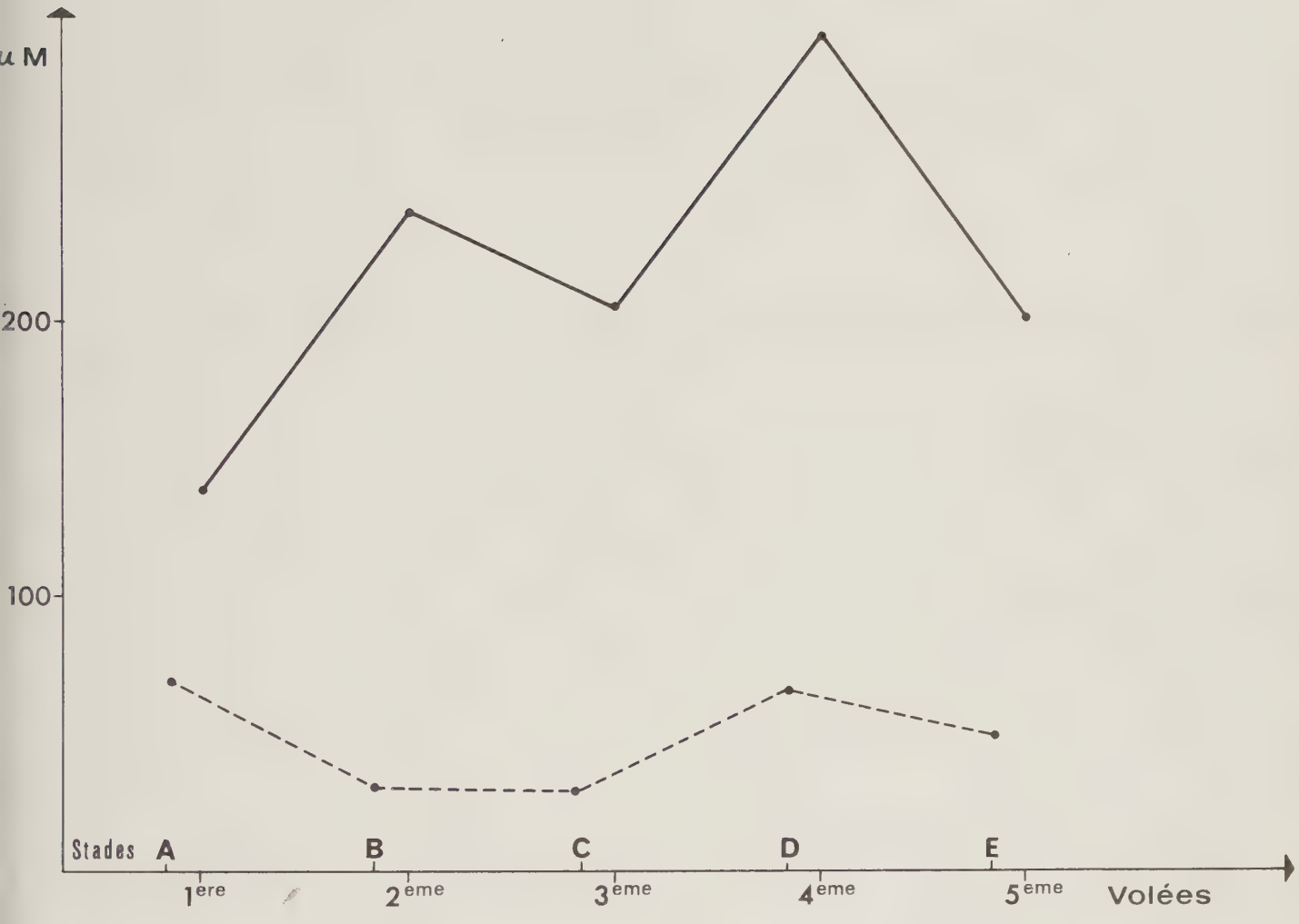


Figure 11 - Evolution des teneurs en amides dans les carpophores (micromoles par g. de matière sèche) ——— et dans le compost (micromoles pour 100 g de matière sèche) - - - - -

II - ACIDES AMINES DE LA FRACTION INSOLUBLE.

Le tableau XVIII groupe les résultats obtenus par dosage des aminoacides libérés par hydrolyse du culot.

La fraction insoluble du compost est beaucoup plus riche en acides aminés que la fraction soluble. Ce fait a déjà été signalé par DELMAS et POITOU (1965) et, plus récemment, par DELMAS, POITOU et DELPECH (1968 a). En fonction du temps de culture, le rapport $\frac{\text{azote des acides aminés de la fraction insoluble}}{\text{azote des acides aminés et amides libres}}$ atteint successivement les valeurs suivantes : 61,9 ; 64,2 ; 90,2 ; 68,8 ; 71,1 et 110,8. Il est maximum aux stades C et F et cette évolution dans le temps pourrait s'interpréter comme suit :

- le développement de la deuxième volée diminuerait considérablement la quantité de composés azotés solubles, ce qui expliquerait les faibles teneurs enregistrées au stade C.
- en fin de culture (stade F), l'arrêt de la production de carpophores coïnciderait avec une forte baisse de la dégradation des macromolécules du compost, d'où la part plus restreinte de la fraction azotée libre.

L'acide glutamique, le glycocolle, l'α-alanine et l'acide aspartique représentent respectivement 12,5 %, 12,4 %, 11,1 % et 10,7 % des composés dosés dans la fraction insoluble. Viennent ensuite, par ordre d'importance décroissante, la leucine, la valine, la proline, la sérine, la thréonine, l'isoleucine, la lysine et la phénylalanine. Les teneurs en arginine, histidine, tyrosine et acides aminés soufrés sont plus faibles.

Si l'utilisation progressive des éléments nutritifs entraîne leur diminution régulière, il est à souligner que les proportions relatives des différents constituants restent sensiblement les mêmes à tous les stades : ceci paraît indiquer que toutes les macromolécules azotées du compost sont dégradées de façon identique tout au long de la phase de fructification.

TABLEAU XVIII

Acides aminés de la fraction insoluble du compost

Composés dosés pour 1 g de matière sèche	Stade A		Stade B		Stade C		Stade D		Stade E		Stade F	
	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %	en µM	en %
Lysine	26,3	4,3	25,6	4,5	22,1	4,2	20,7	4,2	19,8	4,2	18,0	4,1
Arginine	24,2	3,9	20,7	3,6	18,5	3,5	18,0	3,6	16,5	3,5	13,6	3,1
Acide aspartique	64,5	10,5	61,9	10,8	56,6	10,7	54,1	10,8	51,0	10,8	47,9	10,8
'' glutamique	80,0	13,0	76,5	13,4	65,8	12,4	59,0	11,9	56,8	11,9	53,6	12,2
Glycocolle	73,5	11,9	68,0	11,9	64,9	12,2	62,8	12,6	61,0	12,9	58,3	13,1
α-Alanine	69,4	11,3	61,3	10,7	57,7	10,9	55,8	11,2	52,8	11,2	49,8	11,2
Valine	42,1	6,8	39,3	6,9	33,8	6,4	32,5	6,5	31,2	6,6	30,3	6,8
Leucine	48,2	7,8	43,6	7,6	40,6	7,7	39,0	7,8	36,8	7,8	34,2	7,7
Isoleucine	28,5	4,6	25,9	4,5	24,8	4,7	23,6	4,7	22,7	4,8	22,0	4,9
Sérine	36,1	5,9	35,0	6,1	34,1	6,4	33,2	6,6	30,6	6,5	28,6	6,4
Thréonine	34,4	5,6	32,7	5,7	30,9	5,8	29,9	6,0	28,4	6,0	26,8	6,0
Histidine	9,1	1,5	8,4	1,5	7,5	1,4	7,2	1,4	6,6	1,4	6,0	1,3
Proline	37,3	6,1	36,5	6,4	32,8	6,2	29,0	5,8	26,5	5,6	24,4	5,5
Tryptophane	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Méthionine	9,5	1,6	9,4	1,6	9,4	1,8	9,3	1,9	8,5	1,8	7,5	1,7
Méthionine sulfoxide	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Cystine	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Tyrosine	6,7	1,1	5,3	0,9	7,4	1,4	5,6	1,1	5,2	1,1	4,6	1,1
Phénylalanine	25,0	4,1	22,3	3,9	22,9	4,3	19,5	3,9	18,4	3,9	18,2	4,1
Total :	614,8	100,0	572,4	100,0	529,8	100,0	499,2	100,0	472,8	100,0	443,8	100,0
N acides aminés	366,0		338,5		311,2		294,2		277,7		257,3	

III - ACIDES AMINES UTILISES EN FONCTION DU TEMPS DE CULTURE.

Il m'a semblé intéressant de dresser le bilan (tableau XIX) en acides aminés totaux (libres et combinés), disparus du compost entre chaque prélèvement c'est-à-dire durant les périodes correspondant approximativement à la sortie des différentes volées.

Toutefois, avant de discuter ces résultats, deux remarques s'imposent.

- Les modifications enregistrées globalement dans le milieu de culture constituent la résultante de plusieurs phénomènes : formation des carpophores d'Agaricus bisporus, développement du mycélium mais aussi des microorganismes coexistant dans le compost. La complexité du problème se trouve accrue du fait que les éléments nutritifs utilisés pour la croissance végétative du blanc ne sont pas les mêmes que ceux qui disparaissent préférentiellement pendant la fructification (GERRITS, BELS-KONING et MULLER, 1965 ; GERRITS, 1969). Le rôle exact joué par les microorganismes dans les remaniements du sbstratum est encore mal connu.

- On doit rappeler qu'il est impossible, dans les échantillons de compost analysés, de séparer la matière inerte des organismes vivants qu'elle renferme, ce qui réduit dans une certaine mesure la signification des bilans effectués.

Compte-tenu de ces restrictions, il apparaît que les utilisations les plus fortes d'acides aminés coïncident avec la sortie des première et deuxième volées : ceci semblerait indiquer qu'il existe une relation entre le développement des fructifications et l'utilisation des aminoacides du compost.

TABLEAU XIX

Utilisation des aminoacides du compost en fonction de la production de carpophores

	1ère volée	2ème volée	3ème volée	4ème volée	5ème volée
Acides aminés utilisés, en µMoles pour 100 g de compost sec	4260,2	4952,1	2601,2	2715,2	3072,5
Principaux acides aminés utilisés en % de la quantité totale :					
Arginine	8,4	4,6	1,7	5,7	9,5
Acide aspartique	5,8	11,2	9,6	11,5	10,5
'' glutamique	8,7	22,6	26,5	9,1	12,5
Glycocolle	12,9	6,4	8,2	6,3	9,4
α-Alanine	18,7	8,2	6,7	11,4	9,9
Valine-Leucine-Isoleucine	23,2	20,4	14,9	16,7	13,6
Sérine - Thréonine	6,4	6,0	7,1	15,4	12,0
Proline	2,9	7,6	14,3	9,1	8,5
Tyrosine - Phénylalanine	9,4	2,9	4,4	5,7	2,6

Des différences sensibles apparaissent dans la composition centésimale des composés disparus aux diverses étapes d'une culture. En fonction du temps, on peut noter la diminution des proportions relatives d'α-alanine, des acides aminés aromatiques et de l'ensemble valine-leucine-isoleucine. La sérine, la thréonine et l'acide aspartique suivent une évolution inverse. Durant le développement de la troisième volée, dont les carpophores renferment des teneurs importantes en proline et en arginine libres, on remarque une très faible utilisation de ce dernier aminoacide et, par contre, une forte disparition de l'acide glutamique et de la proline du compost.

C - ADDITIONS AU COMPOST D'ELEMENTS NUTRITIFS AZOTES - LEUR REPERCUSSION SUR LA COMPOSITION DES CARPOPHORES.

Les résultats qui viennent d'être exposés m'ont incité à vérifier si,

au cours d'une même culture, les substances azotées libres du substratum nutritif étaient utilisées de façon identique. Dans ce but, des apports, dans le milieu, d'acide glutamique, de proline, d'arginine et de créatine ont été effectués 3 à 5 jours avant la sortie des première et troisième volées. Pour chacune de ces substances, les quantités introduites ont été fixées, après plusieurs expériences préliminaires, à 500 micromoles pour 100 g de compost sec.

J'ai opéré sur des cultures en pots, selon une méthode analogue à celle décrite par SAN ANTONIO (1966) ; le composé est dissout dans 50 ml d'eau distillée et la solution obtenue, préalablement ajustée à pH 6,5, est directement introduite dans le compost, à une profondeur d'environ 4 cm, en plusieurs points du pot. Après récolte des carpophores, les acides aminés sont dosés : le tableau XX donne les variations, en %, enregistrées dans chaque cas par rapport à des champignons cultivés sur milieu normal et servant de témoins.

TABLEAU XX

Incidences d'apports d'éléments nutritifs dans le milieu sur la composition en acides aminés libres des carpophores (variations en % par rapport à des carpophores témoins)

	Additions de							
	Ac. glutamique		Proline		Arginine		Créatine	
	1ère volée	3ème volée	1ère volée	3ème volée	1ère volée	3ème volée	1ère volée	3ème volée
Arginine	+ 113	+ 180	+ 149	+ 76	- 30	+ 78	+ 23	+ 62
Ornithine	+ 89	+ 122	+ 86	+ 117	+ 39	+ 180	+ 17	+ 57
Acide aspartique	- 13	+ 28	+ 20	+ 22	- 12	+ 40	+ 4	+ 16
'' glutamique	- 25	+ 47	+ 58	+ 18	- 29	+ 42	+ 11	+ 21
Glycocolle	- 19	+ 22	+ 40	0	- 29	+ 44	+ 7	+ 7
α-Alanine	- 21	+ 27	+ 42	+ 10	- 35	+ 29	0	+ 27
Proline	- 45	+ 68	+ 73	+ 66	- 71	+ 23	+ 132	+ 45
Acide γ-aminobutyrique	+ 100	+ 112	+ 200	+ 512	0	+ 100	0	+ 9
Amides (glutamine + asparagine	+ 25	+ 8	+ 80	+ 168	+ 5	+ 234	+ 4	+ 8

On constate que les additions effectuées avant l'apparition de la troisième volée entraînent les augmentations les plus marquées des quantités d'acides aminés libres des carpophores. Par contre, l'acide glutamique et l'arginine ajoutés au compost en début de culture provoquent une diminution quasi-générale des aminoacides libres des champignons. Les teneurs en arginine, ornithine et, dans certains cas, en acide γ-aminobutyrique sont toujours les plus modifiées. On doit souligner également que la créatine paraît participer, de façon directe ou indirecte, à l'anabolisme de l'arginine : ce problème sera envisagé dans la suite de ce travail.

D - CONCLUSIONS.

Des modifications dans la composition quantitative du compost en acides aminés et amides libres ont été notées en fonction du temps de culture. Leur ampleur est toujours limitée et elles ne paraissent pas susceptibles de fournir une explication directe aux teneurs variables en constituants azotés solubles des carpophores issus des poussées successives, sauf peut-être en ce qui concerne la glutamine et l'asparagine.

TRESCHOW (1944), CASIMIR et HEINEMANN (1958) et BOHUS (1959) ont étudié les besoins nutritifs du mycélium d'Agaricus bisporus, cultivé in vitro sur milieu synthétique, et précisé les sources d'azote utilisées préférentiellement. Le tableau XXI résume l'essentiel de leurs conclusions.

TABLEAU XXI

Nutrition azotée du mycélium d'Agaricus bisporus : influence de la nature de la source d'azote sur le rendement pondéral en mycélium, d'après TRESCHOW (1944), CASIMIR et HEINEMANN (1953), et BOHUS (1959)

	Sources de N utilisées		
	TRESCHOW (1944)	CASIMIR et HEINEMANN (1953)	BOHUS (1959)
Rendements optima	asparagine acide glutamique	asparagine α-alanine	asparagine glycocolle acide aspartique
Rendements moyens	glycocolle α-alanine leucine sels d'ammonium	glutamine sérine glycocolle leucine proline méthionine cystine	valine urée sels d'ammonium
Rendements faibles ou nuls	nitrate β-alanine	phénylalanine thréonine arginine valine lysine histidine ac. aspartique '' glutamique '' γ-aminobutyrique cystéine tryptophane tyrosine	nitrate β-alanine

Comme on peut le constater, les sources azotées minérales conduisent en général à une croissance mycélienne moyenne (ion ammonium) ou pratiquement nulle (ion nitrate) ; de plus, selon TRESCHOW (1944) et DELMAS (1961), la présence dans les composts de quantités trop importantes d'ammoniaque nuit considérablement au rendement de la culture. Les acides aminés et les amides constituent par contre de

meilleurs aliments azotés : l'asparagine, l'α-alanine, le glycocolle, la leucine, la glutamine, la sérine, la proline, la méthionine, la cystine, la valine et l'urée permettent un développement satisfaisant du mycélium. Le rôle des acides glutamique et aspartique est par contre plus controversé, les constatations de TRESCHOW et BOHUS différant, à ce point de vue, de celles de CASIMIR et HEINEMANN.

L'étude des constituants azotés du compost m'a permis de déterminer les aminoacides les plus fortement utilisés en cours de culture. Ce sont, par ordre d'importance décroissante : l'acide glutamique, l'α-alanine, l'acide aspartique, le glycocolle, la leucine, la proline et la valine. J'ai insisté sur la prudence avec laquelle on doit accueillir ces résultats ; on remarque toutefois que tous les composés précités figurent parmi les possibles sources d'azote pour le mycélium d'Agaricus bisporus.

J'ai par ailleurs observé des différences dans les proportions relatives des acides aminés disparus du substratum nutritif pendant le développement de chaque poussée de carpophore. On note en particulier qu'en troisième volée la part qui revient à l'acide glutamique et à la proline passe par un maximum, celle de l'arginine étant au contraire la plus réduite. De même, les additions dans le compost de substances azotées, lorsqu'elles sont effectuées avant la sortie de la troisième volée, provoquent une augmentation beaucoup plus marquée des aminoacides et amides libres des carpophores obtenus à partir de ce milieu enrichi. Ces faits expérimentaux suggèrent l'existence, en fonction du phénomène des volées, de variations soit dans la perméabilité aux substances dissoutes, soit dans le déroulement de certains processus métaboliques. Ce dernier point m'a paru constituer un sujet de travail intéressant. Son étude pouvait conduire, d'un point de vue général, à une meilleure connaissance de quelques aspects de la nutrition et du métabolisme azotés d'Agaricus bisporus, et, dans un domaine plus restreint, à une possible explication des modifications enregistrées dans les bilans en acides libres des carpophores appartenant aux différentes volées.

TROISIEME PARTIE

IMPORTANCE DES REACTIONS DE TRANSAMINATION DANS LA BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES D'*Agaricus bisporus*.

A - ETUDE DES ACIDES CETONIQUES.

I - Technique d'extraction et de dosage.

1 - Extraction des cétoacides et formation des 2-4 dinitrophénylhydrazones.

2 - Extraction des 2-4 dinitrophénylhydrazones.

3 - Réduction des 2-4 dinitrophénylhydrazones et dosage des acides aminés.

II - Teneurs en cétoacides des carpophores issus des volées successives.

B - ETUDE COMPARATIVE DES ACIDES ORGANIQUES NON CETONIQUES.

C - BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES PAR TRANSAMINATION.

I - Mise en évidence des réactions de transamination.

II - Détermination du donneur préférentiel du groupement $-NH_2$; pH optimum d'action.

III - Activité enzymatique des champignons provenant des volées successives d'une même culture.

D - METABOLISME DE L'ACIDE GLYOXYLIQUE.

I - Conditions optimales d'action de la transaminase α-alanine-acide glyoxylique.

1 - Purification partielle.

2 - Détermination des conditions optimales d'action.

3 - Spécificité de la L-α-alanine comme donneur de $-NH_2$.

II - Utilisation *in vivo* du glyoxylate 1-2 ^{14}C dans les carpophores d'*Agaricus bisporus*.

1 - Protocole expérimental.

2 - Résultats.

E - CONCLUSIONS.

IMPORTANCE DES REACTIONS DE TRANSAMINATION DANS LA BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES D'*Agaricus bisporus*.

Plusieurs travaux, le plus souvent effectués à partir de composés marqués au ^{14}C, avaient suggéré l'intervention de réactions de transamination dans la formation de quelques acides aminés des carpophores d'*Agaricus bisporus* : glycocolle, alanine, acides aspartique et glutamique (REINBOTHE et TSCHIERCH, 1962 ; LE ROUX, 1962 a, 1962 b, 1966). Plus récemment, BOLLIGER, RAST et BACHOFEN (1966) ont démontré l'existence des transaminases* acide aspartique-acide α-cétoglutarique et alanine-acide α-cétoglutarique. Les résultats que je me propose d'exposer portent, d'une part sur la caractérisation et le dosage des acides cétoniques du champignon de couche et, d'autre part, sur l'étude de la participation de ces composés à la biosynthèse enzymatique des aminoacides par transamination. Depuis la découverte par BRAUNSTEIN et KRITZMANN, en 1937, d'une réaction enzymatique de transfert intermoléculaire du groupement $-NH_2$, l'importance prise par ces processus dans le métabolisme azoté, animal et végétal, est désormais bien établie. Il n'entre pas dans mes intentions de faire ici le point de l'ensemble des connaissances acquises sur un aussi vaste sujet et les données se rapportant plus directement à mes propres constatations seront discutées ultérieurement. Toutefois, en plus du rôle capital que jouent les transaminations dans la biosynthèse des aminoacides (GREEN, LELOIR et NOCITO, 1945 ; WILSON, KING et BURRIS, 1953 ; MEISTER, 1955 et 1965 ; GUIRARD et SNELL, 1964), je soulignerai également leur implication, chez les champignons, dans les mécanismes d'absorption des groupements $-NH_2$ (MONTANT, 1964).

---

* Soit le système ci-dessous :

Acide aspartique + acide α-cétoglutarique $\rightleftharpoons$ acide oxaloacétique + acide glutamique

L'enzyme est désignée soit par les deux acides aminés impliqués dans la réaction (transaminase acide aspartique - acide glutamique), soit par les premiers donneur et accepteur du groupement $-NH_2$ (transaminase acide aspartique - acide α-cétoglutarique). Bien que moins fréquemment adoptée, j'ai préféré la seconde possibilité qui a le mérite de faire ressortir la composition initiale du mélange réactionnel.

A - ETUDE DES ACIDES CETONIQUES.

I - TECHNIQUE D'EXTRACTION ET DE DOSAGE. *

Les acides cétoniques, transformés en leurs 2-4 dinitrophénylhydrazones, sont dosés après réduction en acides aminés.

1 - Extraction des cétoacides et formation des 2-4 dinitrophénylhydrazones.

Les méthodes d'extraction des cétoacides et le mode de formation de leurs 2-4 dinitrophénylhydrazones varient selon les auteurs. La solution la plus rationnelle paraissait être celle adoptée par TOWERS, THOMPSON et STEWARD (1954) et KRETOVITCH et GEIKO (1964) qui consiste en un broyage du matériel végétal dans la solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine. Ce mode opératoire, dans le cas du champignon de couche, conduit à des résultats médiocres et la nécessité d'une défécation préalable s'impose. Le mélange défécant retenu est celui préconisé par CAVALLINI et FRONTALI (1954) :

Tungstate de sodium à 10 %	:	1 volume
Acide sulfurique 2/3 N	:	1 volume
Eau distillée	:	3 volumes

Il a été préféré au réactif au métaphosphate de FRIEDEMANN et HAUGEN (1953) ; le tungstate aboutit en effet à une meilleure défécation que le métaphosphate, ce dernier composé entraînant en outre la formation d'une émulsion lors de l'extraction ultérieure des 2-4 dinitrophénylhydrazones par l'acétate d'éthyle. L'acide trichloracétique, soluble dans les solvants des hydrazones et perturbant, de ce fait, leur récupération et leur réduction, a également été écarté.

Le protocole expérimental adopté est le suivant : après fixation dans l'azote liquide (10 minutes), le matériel végétal (prise d'essai : 20 g., poids frais) est broyé à l' ''omnimixer Sorvall'' dans 100 ml de mélange défécant préalablement refroidi (environ 2° C). Le broyat est agité pendant 30 minutes, centrifugé (10 000 g, - 2° C, 10 minutes), et le culot de centrifugation est lavé 3 fois par du défécant glacé. Ces différentes opérations se déroulent à basse température (0 à 4° C). Les acides cétoniques sont ensuite transformés en leurs 2-4 dinitrophénylhydrazones par addition, au liquide d'extraction, de 1/10e de son volume

---

* Je remercie Madame J. GARROS et Monsieur M. PIQUEMAL, Assistants, qui ont participé à l'élaboration de ce protocole expérimental.

d'une solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine à 1 % dans l'acide sulfurique (VIRTANEN, MIETTINEN et KUNTTU, 1953). L'ensemble est mis à agiter pendant deux heures à une température voisine de 0° C et abandonné une nuit au réfrigérateur. Ceci a pour but d'éviter l'altération de certains composés et en particulier la décomposition partielle de l'acide oxalacétique en acide pyruvique, constatée lorsqu'on opère à 20° C. Dans le cas où la formation des phénylhydrazones des autres cétoacides serait incomplète dans ces conditions, le mélange liquide d'extraction-dinitrophénylhydrazine est enfin agité, pendant 3 heures, à 25° C (TOWERS, THOMPSON et STEWARD, 1954 ; VIRTANEN, MIETTINEN et KUNTTU, 1953 ; CAVALLINI et FRONTALI, 1954).

2 - Extraction des 2-4 dinitrophénylhydrazones.

Une première série de traitements par l'acétate d'éthyle, l'éther sulfurique et le benzène permet une extraction globale de l'ensemble des hydrazones, la phénylhydrazine en excès restant dans la fraction aqueuse. Acétate d'éthyle et éther sulfurique sont les solvants les plus couramment cités dans la littérature (VIRTANEN et coll., 1953 ; TOWERS et coll., 1954 ; CAVALLINI et FRONTALI, 1954 ; KRETOVITCH et GEIKO, 1964). L'utilisation du benzène permet en plus une meilleure solubilisation des dérivés correspondant aux acides cétoniques dont la molécule renferme plus de 5 atomes de C (KAWANO, KATSUKI, YOSHIDA et TANAKA, 1962).

Les 2-4 dinitrophénylhydrazones des cétoacides sont ensuite séparées de façon spécifique de la phase ''solvants organiques'' par emploi d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 10 %. Elles sont enfin récupérées de la fraction carbonatée, préalablement amenée à pH 2 par addition d'acide sulfurique 5 N, au terme d'un ultime traitement par l'acétate d'éthyle, l'éther sulfurique et le benzène. L'extrait obtenu est évaporé à sec, sous pression réduite, à 30° C, et le résidu est dissous dans 100 ml d'un mélange volume à volume d'acétate d'éthyle et d'éthanol à 95° G.L.

Remarque : Dans tous les cas, les extractions ont été réalisées, dans une ampoule à décanter, par épuisements successifs, la quantité de liquide utilisée pour chaque épuisement étant de 30 à 40 ml ; l'opération n'est arrêtée que lorsque le solvant employé reste pratiquement incolore.

3 - Réduction des 2-4 dinitrophénylhydrazones* et dosage des acides aminés formés.

La réduction des 2-4 dinitrophénylhydrazones, aboutissant à la transfor-

---

* Je remercie Monsieur le Professeur LATTES et Monsieur LAYOLLE, Maître-Assistant, dont les conseils m'ont été très précieux dans la mise au point de cette technique

mation des acides cétoniques en acides aminés correspondants, a été effectuée à 20° C, pendant 3 heures, sous courant d'hydrogène et en présence du catalyseur au palladium sur charbon actif Fluka (500 mg de catalyseur pour une prise d'essai de 50 ml de la solution d'hydrazone dans le mélange acétate d'éthyle-éthanol). Cette méthode a donné de meilleurs résultats que ceux obtenus, dans nos conditions d'expérience, par utilisation du catalyseur palladium-bore de GEIKO, KRETOVITCH, POLKOVNIKOV et TABER (1963) ou d'oxyde de platine (TOWERS, THOMPSON et STEWARD, 1954 ; MEISTER et ABENDSCHEIN, 1956). Les acides aminés formés sont dosés, après passage sur résine Dowex 50, élution à l'ammoniaque et chromatographie sur papier, selon la technique de BISERTE et coll. (1960). Dans le cas particulier du champignon de couche l'extraction des 2-4 dinitrophénylhydrazones présente certaines difficultés. De plus, leur réduction est incomplète. Ces faits ont nécessité la réalisation d'essais témoins au cours desquels des quantités connues d'acides cétoniques sont incorporées au broyat végétal initial et dosées suivant la méthode qui vient d'être exposée. Les résultats sont groupés dans le tableau XXII.

TABLEAU XXII

Rendements de récupération d'acides cétoniques témoins.

Acides cétoniques	Quantités d'acides dosés en % de la quantité initiale introduite	
	Essai I	Essai II
Acide glyoxylique	33	35
'' pyruvique	56	58
'' hydroxypyruvique	20	20
'' oxalacétique	20	19
'' α-cétoglutarique	55	59
'' phénylpyruvique	40	41

Les rendements, souvent faibles, sont inférieurs à ceux donnés par GEIKO et coll. (1963) ; ils sont toutefois du même ordre, sauf en ce qui concerne l'acide oxalacétique, que ceux obtenus par VIRTANEN, MIETTINEN et KUNTTU (1953) et TOWERS,

THOMPSON et STEWARD (1954). En outre, la reproductibilité des résultats est satisfaisante. Ces constatations m'ont amené à adopter ce protocole expérimental, malgré les imperfections qu'il présente. Il est préférable à une étude par chromatographie sur papier, sans réduction préalable, des 2-4 dinitrophénylhydrazones : ces composés existent, pour un même cétoacide sous leur forme cis et trans, ce qui entraîne le plus souvent l'apparition sur un chromatogramme, de deux taches par acide. Cet inconvénient rend, dans le cas d'un mélange complexe, toute détermination quantitative très aléatoire.

II - TENEURS EN CETOACIDES DES CARPOPHORES ISSUS DES VOLEES SUCESSIVES.

J'ai représenté, à titre d'exemple, sur la figure 12 le chromatogramme

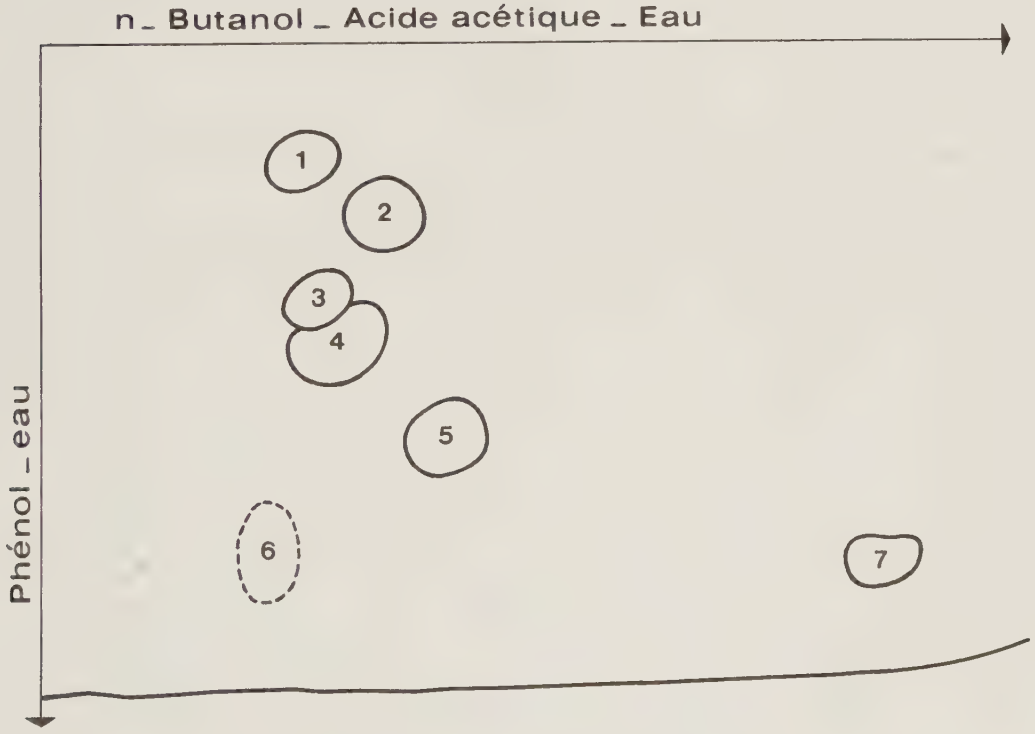


Figure 12 - Acides aminés obtenus par réduction des 2-4 dinitrophénylhydrazones des cétoacides (carpophores de 4eme volée).

1 : ac. aspartique ; 2 : ac. glutamique ; 3 : sérine ; 4 : glycocolle ; 5 : alanine ; 6 : lysine ; 7 : phénylalanine.

des acides aminés obtenus après réduction des 2-4 dinitrophénylhydrazones extraites des carpophores d'Agaricus bisporus (4ème volée).

On identifie le glycocolle, l'alanine, les acides glutamique et aspartique, la sérine, la phénylalanine et, en très faible quantité, la lysine. J'ai vérifié que leur présence ne peut résulter d'une extraction partielle des substances azotées solubles du végétal : une analyse chromatographique, avant réduction, de la fraction dinitrophénylhydrazinique ne conduit à la mise en évidence d'aucun aminoacide. Ces résultats permettent donc de caractériser dans le champignon de couche, les acides glyoxylique, pyruvique, α-cétoglutarique, oxalacétique, hydroxypyruvique, phénylpyruvique et α-céto-ε-aminocaproïque. Les trois premiers de ces composés avaient été signalés par LE ROUX (1966). Compte-tenu des rendements de réduction, les teneurs en cétoacides des carpophores (stade II) issus des volées successives figurent dans le tableau XXIII.

TABLEAU XXIII

Acides cétoniques des carpophores issus des volées successives.

Composés, en micromoles/g. de matériel sec	1ère volée	2ème volée	3ème volée	4ème volée	5ème volée
Acide glyoxylique	4,2	4,9	5,4	4,4	4,0
'' pyruvique	0,4	0,3	0,3	0,15	0,2
'' hydroxypyruvique	3,9	3,4	2,0	1,3	1,1
'' oxalacétique	0,1	0,4	0,3	0,3	0,3
'' α-cétoglutarique	1,0	0,7	0,4	0,6	0,4
'' phénylpyruvique	0,6	0,8	0,7	0,6	0,4
'' α-céto-ε-aminocaproïque	-	-	-	+	+

Quantitativement, l'acide glyoxylique est le plus représenté : viennent ensuite, par ordre d'importance décroissante, les acides hydroxypyruvique, α-cétoglutarique, phénylpyruvique, pyruvique et oxalacétique. L'acide α-céto-ε-aminocaproïque n'a été décelé, à l'état de traces, que dans les échantillons récoltés en fin de culture. Cette prédominance de l'acide glyoxylique pouvait avoir pour origine la décomposition, partielle ou totale, en cours d'extraction, de l'acide allantoïque préexistant dans le végétal. Cette hypothèse a été infirmée par dosage

simultané de l'acide glyoxylique et de son uréide selon le protocole mis au point par DURAND (1963). Les teneurs en acide allantoïque d'Agaricus bisporus sont d'ailleurs peu élevées (BRUNEL, 1936).

On remarque que les concentrations en acides cétoniques du champignon de couche sont toujours faibles, ce qui s'explique par la rapidité avec laquelle ces composés sont métabolisés in vivo. Des faits similaires ont été constatés dans des plantules de graminées et de légumineuses par KRETOVITCH et GEIKO (1964) et dans les tissus de Suaeda macrocarpa et Aster tripolium par BRIENS (1967). Le tableau XXIV donne, à titre de comparaison, un aperçu des chiffres avancés par KRETOVITCH et GEIKO (1964) (plantules de maïs et de pois). Les résultats sont exprimés en micromoles par gramme de matériel frais.

TABLEAU XXIV

Teneurs moyennes en cétoacides des carpophores d'Agaric, comparativement à d'autres végétaux (KRETOVITCH et GEIKO, 1964).

Composés, en micromoles/g. de végétal frais	Carpophores d'Agaric	Plantules de Maïs		Plantules de Pois	
		Feuilles	Racines	Feuilles	Racines
Acide glyoxylique	0,46	0,48	0,05	0,30	0,10
" pyruvique	0,03	0,12	0,01	0,05	0,05
" hydroxypyruvique	0,22	0,03	0,01	0,03	0,01
" oxalacétique	0,03	traces	traces	traces	traces
" α-cétoglutarique	0,06	0,12	0,15	0,03	0,02
" phénylpyruvique	0,06	0,0	0,0	0,0	0,0

L'évolution des cétoacides en fonction du phénomène des volées diffère sensiblement de celle des composés azotés solubles. Il est à noter tout d'abord que l'amplitude des variations enregistrées est beaucoup plus faible. KANAZAWA, KANAZAWA et NISHIMURA (1967) ont établi que, dans des cellules de chlorelles prises à différents stades de développement, les rapports entre les concentrations des acides cétoniques (acides pyruvique et α-cétoglutarique) et celles des aminoacides correspondants (alanine et acide glutamique) variaient de façon identique. Dans le cas des carpophores d'Agaricus bisporus, les rapports des teneurs

$\frac{\text{glycocolle}}{\text{acide glyoxylique}}$, $\frac{\text{sérine}}{\text{acide hydroxypyruvique}}$ et $\frac{\text{phénylalanine}}{\text{acide phénylpyruvique}}$ ont des valeurs très nettement inférieures aux rapports $\frac{\text{alanine}}{\text{acide pyruvique}}$, $\frac{\text{acide aspartique}}{\text{acide oxalacétique}}$ et $\frac{\text{acide glutamique}}{\text{acide α-cétoglutarique}}$.

B - ETUDE COMPARATIVE DES ACIDES ORGANIQUES NON CETONIQUES.

Dans la quasi totalité des cas, les champignons de première et deuxième volées sont les plus riches en acides cétoniques. J'ai été conduit à vérifier si une telle remarque s'applique également aux autres acides organiques et en particulier à ceux impliqués dans le cycle tricarboxylique. Le tableau XXV permet de répondre à cette question.

TABLEAU XXV

Principaux acides organiques non volatils des carpophores d'Agaricus.

Composés en micromoles/ g. de végétal sec	1ère volée	2ème volée	3ème volée	4ème volée	5ème volée
Acide citrique	2,1	2,2	1,8	1,4	1,9
'' succinique	6,2	6,5	4,6	5,7	4,4
'' fumarique	17,2	13,3	12,2	14,2	12,9
'' malique	83,5	79,4	51,6	61,3	68,5
'' pyrrolidone-carboxylique	26,0	27,6	27,9	25,6	15,2

Les acides organiques non volatils sont extraits du matériel végétal, préalablement fixé à l'azote liquide, par l'éthanol à 60° G.L. et l'eau additionnée de résine Dowex 50, forme H^+, selon la méthode de ROUX et LESAINT (1959). L'extrait est concentré par évaporation sous pression réduite à 30° C et passé sur résine Dowex 50, forme H^+, puis Dowex 2, forme carbonate. La fraction anionique, éluée par le carbonate d'ammonium 0,5 M et la soude N (BOVE, BOVE et RAVEUX, 1957), est analysée par chromatographie sur colonne de Dowex 1 (HULME et WOOLTORTON, 1958) et sur colonne de gel de silice (RAVEUX et BOVE, 1957 ; BOVE et RAVEUX,

(1957) *.

L'acide malique est dans tous les cas prépondérant. Les acides fumarique, succinique et citrique sont également présents, mais en quantités moindres. Ces résultats sont en accord avec les travaux de LE ROUX (1961, 1966). Cet auteur a signalé une accumulation marquée d'acide citrique dans l'hyménium comparativement au stipe et à la partie stérile du chapeau. Au stade II, les lamelles ne représentent qu'une partie restreinte du poids total du carpophore : ceci pourrait expliquer que je n'ai trouvé que de faibles concentrations en acide citrique. On peut aussi remarquer l'importance de l'acide pyrrolidone carboxylique. Ce corps est généralement considéré comme un artéfact provenant de la décomposition de l'acide glutamique et de la glutamine sur colonne de résine Dowex 50 (ELLFOLK et SYNGE, 1955). Il se pose donc le problème de savoir si cette hypothèse doit être uniquement retenue ou si, au contraire, l'acide pyrrolidone carboxylique joue un rôle actif dans le métabolisme du champignon de couche. Je signalerai également que des traces d'acide oxalique ont été mises en évidence : ce composé se rencontre surtout dans les premiers stades de développement du carpophore et tend à disparaître par la suite (LE ROUX, 1961). La présence des acides isocitrique, glycolique et citramalique n'a pu être établie de façon certaine : des pics de faible amplitude, pouvant correspondre à ces substances, ont été souvent observés au cours des séparations sur colonne de résine Dowex 1 ou de gel de silice ; cependant l'analyse de ces pics par chromatographie sur papier n'a pas donné de résultats absolument concluants.

Le dosage des acides du cycle de KREBS dans les carpophores appartenant aux différentes poussées d'une même culture fait ressortir, tout comme pour les acides cétoniques, l'existence d'un léger maximum dans les échantillons de première et deuxième volées. Il est frappant de constater, en outre, que la troisième volée caractérisée par sa richesse en acides aminés solubles et protéiques, renferme par contre les teneurs les plus basses en acides organiques.

---

* Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur J. BOVE, Chef du Département de Biochimie à l'I.F.A.C., qui m'a permis d'effectuer un stage dans son laboratoire et qui m'a initié à cette technique de séparation et de dosage des acides organiques.

C - BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES PAR TRANSAMINATION.

Pour chacun des cétoacides caractérisés dans les carpophores d'Agaricus bisporus, une étude détaillée a été entreprise concernant :

- la mise en évidence de sa participation à la biosynthèse des aminoacides par réaction de transamination,
- la caractérisation du donneur préférentiel du groupement amino (ces donneurs sont choisis parmi les acides aminés et amides les plus fortement représentés, à l'état libre, dans le végétal),
- la détermination du pH optimum d'action,
- les activités enzymatiques des champignons provenant des diverses volées.

J'envisagerai successivement chacun des points précités, en précisant que le matériel retenu est toujours constitué par des échantillons récoltés au stade II.

I - MISE EN EVIDENCE DES REACTIONS DE TRANSAMINATION.

On prépare les essais et témoins décrits dans le tableau XXVI.

TABLEAU XXVI

Protocole de mise en évidence des réactions de transamination.

	E_1	E_2	T_1	T_2
	(en double exemplaire)			
Matériel végétal (mg)	50	-	50	50
Matériel végétal porté 30 minutes à 100° C (mg)	-	50	-	-
Solution 0,05 M d'acide cétonique (ml)	1	1	1	-
Solution 0,05 M d'acides aminés (ml)	1	1	-	1
Solution aqueuse à 1 mg/ml de pyridoxal-5-phosphate (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
Mélange tampon (ml)	-	-	1	1
Eau distillée (ml)	2	2	2	2
Toluène redistillé (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05

J'ai utilisé comme matériel végétal de la poudre obtenue par broyage des carpophores d'Agaric, séchés sous vide en présence de chlorure de calcium. La solution d'acide cétonique contient, par ml, 50 micromoles d'un des produits suivants : acide glyoxylique (sel de sodium, préparé par oxydation périodique de l'acide tartrique, selon la méthode de RADIN et METZLER, 1955), acides pyruvique, α-cétoglutarique, oxalacétique (Calbiochem), hydroxypyruvique (sel de lithium) et phénylpyruvique (sel de sodium) (Nutrional Biochemicals Corporation). J'ai retenu comme donneur du groupement $-NH_2$, un mélange 0,05 M d'acide glutamique et d'α-alanine (Calbiochem) ; pour les réactions mettant en jeu l'acide α-cétoglutarique et l'acide pyruvique, l'acide aspartique (Calbiochem) remplace respectivement l'acide glutamique et l'α-alanine.

Acide cétonique et acides aminés sont solubilisés dans le mélange tampon acide borique-KCl-CO_3Na_2 d'ATKINS et PANTIN (BRUNEL, 1948), excepté dans le cas des essais concernant l'acide phénylpyruvique, pour lesquels le tampon pyrophosphate-HCl (GAMBORG et WETTER, 1963) a été employé. La valeur du pH a été, après revue bibliographique, fixée à 8,0.

Essais et témoins renferment enfin 100 microgrammes de pyridoxal-5-phosphate (Hoffmann - La Roche), coenzyme des transaminases, et 1 goutte de toluène, ajouté comme antiseptique.

Les différents milieux réactionnels sont portés à 38° C pendant 2 heures ; après défécation au métaphosphate, ils sont analysés par chromatographie bidimensionnelle sur papier et dosage, selon la technique de BISERTE et coll. (1960).

Les résultats obtenus ont permis de montrer que tous les acides cétoniques du champignon de couche pouvaient participer à la biosynthèse enzymatique * des aminoacides. Toutefois, les formations de glycocolle, d'α-alanine, d'acides aspartique et glutamique sont quantitativement plus élevées que celles de sérine et de phénylalanine. La transamination des acides pyruvique, oxalacétique et α-cétoglutarique a été signalée à de multiples occasions chez les végétaux. Je citerai à ce

---

* Les résultats, toujours négatifs, enregistrés en présence de matériel végétal dont les protéines ont été dénaturées par la chaleur (essai E_2) permettent d'affirmer que la formation d'acide aminé caractérisée dans l'essai E_1 résulte d'un processus enzymatique. De plus, ceci exclut l'existence, dans les conditions de l'expérience, d'une fixation purement chimique de groupements amino par les acides cétoniques : de tels phénomènes avaient été observés, essentiellement à partir de l'acide glyoxylique, par NAKADA et WEINHOUSE (1953) et MIX (1961 a, 1961 b).

Le témoin T_1, sans donneur de $-NH_2$, sert à déterminer la concentration

propos les travaux de WILSON, KING et BURRIS (1954), WALKER et RANSON (1958), HILLER et WALKER (1961), ELLIS et DAVIS (1961). L'obtention de glycocolle, de phénylalanine et de sérine, à partir des cétoacides correspondants, quoique classique, a fait l'objet d'un nombre plus restreint de publications. Une transaminase acide glutamique-acide glyoxylique a été signalée dans les feuilles de plusieurs végétaux verts (KOLESNIKOV, 1954), dans les plantules de Phaseolus radiatus (SASTRY et RAMAKRISHNAN, 1961) et de Pinus pinea (GUITTON, 1961) et une transaminase alanine-acide glyoxylique a été caractérisée dans les cellules de Blastocladiella emersonii (Mc CURDY et CANTINO, 1960). TOUZE (1964), dans une étude sur les manifestations physiologiques provoquées chez Cucumis melo par l'anthracnose, a montré que l'acide glyoxylique pouvait transaminer avec la citrulline dans les individus sains, l'intensité de la réaction étant diminuée dans les échantillons parasités. GAMBORG et WETTER (1963), USPENSKAYA, KRETOVITCH et KASHKARAEVA (1964) et BOUDET (1965) ont enfin démontré, chez les plantes supérieures, l'existence d'un transfert enzymatique du groupement $-NH_2$ de plusieurs aminoacides à l'acide phénylpyruvique.

Cette revue bibliographique est forcément incomplète. Cependant, en dehors des travaux de BOLLIGER et coll. (1966) concernant les transaminases acide aspartique-acide α-cétoglutarique et alanine-acide α-cétoglutarique d'Agaricus bisporus, aucune autre référence concernant les champignons Basidiomycètes n'a été rencontrée.

II - DETERMINATION DU DONNEUR PREFERENTIEL DU GROUPEMENT $-NH_2$; pH OPTIMUM D'ACTION.

Le protocole adopté pour cette série d'expériences dérive de celui qui vient d'être décrit à propos de la mise en évidence des réactions de transamination ; il comporte toutefois quelques modifications.

Le matériel enzymatique est constitué par une poudre acétonique préparée comme suit (REINBOTHE, 1964) : un lot de 25 g. de carpophores est broyé à

---

* dans le matériel enzymatique de l'aminoacide correspondant à l'acide cétonique étudié. Il rend également compte de la transamination éventuelle entre le cétoacide considéré et les acides aminés constitutifs de la poudre végétale.

Le témoin T_2 permet de contrôler la stabilité thermique du donneur de radicaux $-NH_2$ et de mettre en évidence une éventuelle action, sur ce composé, de la source d'enzyme.

à l'état frais dans 500 ml d'acétone préalablement refroidie à - 20° C ; après décantation, le résidu est lavé dans environ 100 ml d'acétone, recueilli par centrifugation (10.000 g., - 5° C, 10 minutes) puis séché sous vide pendant 24 heures, en présence de chlorure de calcium. Il a été vérifié que ce traitement n'altérait pas l'activité des transaminases ; il permet de plus d'éliminer une grande partie des composés azotés solubles du végétal, susceptibles de jouer un rôle dans les transferts de $-NH_2$.

L'essai principal E_1 comprend, outre le matériel enzymatique (20 mg), 100 micromoles de donneur éventuel du groupement amino, 40 micromoles d'acide cétonique, 100 microgrammes de pyridoxal-5-phosphate, 1 goutte de toluène, 1 ml d'eau distillée, 1 ml de mélange tampon (tampon d'ATKINS et PANTIN ou pyrophosphate-HCl). Les valeurs de pH retenues s'échelonnent entre 7 et 9 (7,0 - 7,5 - 7,8 - 8,0 - 8,3 - 8,5 - 8,8 - 9,0). Trois essais témoins complètent l'essai principal : T_1 et T_2 où ont été respectivement omis le donneur de $-NH_2$ et l'acide cétonique, E_2, identique à E_1, mais dans lequel le matériel enzymatique a été porté au préalable 30 minutes à 100° C.

La durée des expériences est de 4 heures à 38° C. Les résultats obtenus après chromatographie et dosage des aminoacides des différents milieux réactionnels, sont consignés dans le tableau XXVII. Seules les formations d'acides aminés résultant d'une action enzymatique (n'existant dans aucun des essais témoins) ont été considérées comme positives.

TABLEAU XXVII

Détermination du donneur préférentiel du groupement -NH_2 et du pH optimum d'action des transaminases

Donneurs de - NH_2 envisagés	Transamination avec l'acide					
	Glyoxylique	Pyruvique	Hydroxypyruvique	Oxalacétique	α-cétoglutarique	Phénylpyruvique
Ornithine	-	+	+	-	++	-
Lysine	-	-	-	-	++	-
Arginine	-	-	-	-	++	-
Acide aspartique	-	++	-		+++	+
'' glutamique	-	+++	++	+++		++
Glycocolle		+	-	-	+	-
α-Alanine	+++		+	++	++	-
Acide γ-aminobutyrique	-	+	+	-	++	-
Valine	-	-	-	-	-	-
Sérine	-	+		-	+	-
Proline	-	-	?	-	-	-
Asparagine	-	-	+	-	-	-
Glutamine	-	-	+	-	-	++
Donneur préférentiel	α-Alanine	Ac.glutamique	Ac.glutamique	Ac.glutamique	Ac.aspartique	Ac.glutamique
pH optimum	8,5	7,5	8,5	7,5	8,5	8,5

On constate que, pour la majorité des acides cétoniques (acides pyruvique, hydroxypyruvique, oxalacétique et phénylpyruvique), le donneur préférentiel du groupement amino est l'acide glutamique. Ceci est en accord avec les observations de SANDWAL, ZINK et DIN (1964) qui soulignent le rôle important joué, chez les végétaux, par l'acide glutamique dans la synthèse des aminoacides par transamination.

L'acide oxalacétique ne conduit à la formation d'acide aspartique qu'en présence de deux aminoacides, l'acide glutamique et l'alanine, et, pour l'acide glyoxylique, un seul donneur possible de -NH_2, l'alanine, a été mis en évidence. Par contre, l'acide α-cétoglutarique et, à un degré moindre, les acides pyruvique,

hydroxypyruvique et phénylpyruvique, sont susceptibles d'accepter des groupements amino issus de composés divers. Parmi ceux-ci, il convient de signaler plus particulièrement l'ornithine, l'arginine, la lysine et l'acide γ-aminobutyrique, dont la participation à des réactions de transamination n'est pas fréquemment citée. Toutefois, l'existence dans les plantules de lupin et d'orge des transaminases ornithine-acide α-cétoglutarique, arginine-acide α-cétoglutarique, lysine-acide α-cétoglutarique et acide γ-aminobutyrique-acide α-cétoglutarique a été rapportée par WILSON, KING et BURRIS (1954). Le transfert de $-NH_2$ de l'ornithine à l'acide α-cétoglutarique, surtout envisagé en rapport avec la biosynthèse de la proline, a également été démontré dans les cellules de Neurospora et d'Escherichia coli par FINCHAM (1953) et VOGEL et KOPAC (1959, 1960). La découverte d'un mode de formation de l'acide succinique à partir de la semi-aldéhyde succinique, résultant de la désamination de l'acide γ-aminobutyrique, a conduit différents chercheurs à se pencher sur le métabolisme de ce dernier acide aminé. Des processus de transamination entre l'acide γ-aminobutyrique et plusieurs cétoacides ont ainsi été caractérisés : l'acide α-cétoglutarique est, chez les microorganismes, le meilleur accepteur du groupement amino (SCOTT et JAKOBY, 1959 ; PIETRUSZKO et FOWDEN, 1961) ; la transaminase acide γ-aminobutyrique-acide pyruvique est par contre la plus active chez les plantes supérieures (DIXON et FOWDEN, 1961).

L'asparagine et la glutamine ont enfin une participation très réduite aux réactions de transamination d'Agaricus bisporus, le rôle de la proline et de la valine étant pratiquement nul.

Les valeurs optimales de pH se situent soit à 8,5 (synthèse de glycocolle, de sérine, d'acide glutamique et de phénylalanine), soit à 7,5 (synthèse d'alanine et d'acide aspartique). Deux systèmes réversibles présentent une importance particulière :

Ac. α-cétoglutarique + ac. aspartique $\rightleftharpoons$ ac. glutamique + ac. oxalacétique

Ac. α-cétoglutarique + α-alanine $\rightleftharpoons$ ac. glutamique + ac. pyruvique.

L'étude du pH optimum d'action montre que la formation d'acide glutamique est prépondérante dans les deux cas à pH 8,5, la réaction inverse s'effectuant de façon préférentielle à pH 7,5.

III - ACTIVITES ENZYMATIQUES DES CHAMPIGNONS PROVENANT DES VOLEES SUCCESSIVES D'UNE MEME CULTURE.

Les activités des transaminases ont été déterminées, en fonction du phénomène des volées, pour les différents systèmes acide cétonique- donneur préférentiel du groupement - NH_2. On se place pour chacun d'eux à la valeur du pH reconnue optimale, soit :

- α-alanine - acide glyoxylique, pH 8,5 ;
- acide glutamique - acide pyruvique, pH 7,5 ;
- acide glutamique - acide hydroxypyruvique, pH 8,5 ;
- acide glutamique - acide oxalacétique, pH 7,5 ;
- acide aspartique - acide α-cétoglutarique, pH 8,5 ;
- acide glutamique - acide phénylpyruvique, pH 8,5 ;

Le protocole expérimental est le même que celui qui a été utilisé pour les recherches du donneur préférentiel du groupement amino. Toutefois, la durée de la réaction à 38° C a été limitée à 30 minutes : dans ces conditions il y a proportionnalité directe entre l'activité enzymatique et le temps d'action.

Les résultats, groupés dans le tableau XXVIII, représentent la quantité (en micromoles) d'acides aminés formés enzymatiquement en une minute par un poids de végétal renfermant une millimole d'azote protéique.

TABLEAU XXVIII

Activité enzymatique des carpophores issus des volées successives.

Transaminases	1ère volée	2ème volée	3ème volée	4ème volée	5ème volée
Alanine - ac. glyoxylique	7,0	7,1	7,8	6,5	6,6
Ac. glutamique - ac. pyruvique	7,1	7,8	6,7	6,5	6,5
Ac. glutamique - ac. hydroxy pyruvique	1,1	1,1	2,0	1,1	1,3
Ac. glutamique - ac. oxalacétique	8,0	9,0	8,6	8,1	8,1
Ac. aspartique - ac. α-cétoglutarique	6,3	8,2	8,0	7,2	7,6
Ac. glutamique - ac. phénylpyruvique	0,5	0,5	0,7	0,4	0,3

Comme on peut le constater, les biosynthèses de glycocolle, d'α-alanine et des acides aspartique et glutamique sont, en valeur absolue, les plus importantes. Les activités des transaminases acide glutamique - acide hydroxypyruvique et surtout acide glutamique - acide phénylpyruvique sont en revanche plus limitées. Je signalerai, à titre de comparaison, que les formations d'acides aspartique et glutamique mises en évidence dans les carpophores d'Agaricus bisporus sont plus élevées que celles détectées par LEONARD et BURRIS (1947) chez différents végétaux verts : plantules de haricot, céréales, pois, radis, concombre et trèfle. De même, par rapport aux résultats obtenus par SINHA, SIROHI et ABROL (1967) à partir de diverses plantes chlorophylliennes (radis, blé, tomate, lathyrus), la synthèse de phénylalanine s'effectue chez l'Agaric avec une intensité souvent supérieure.

Ce rôle particulièrement important que semblent jouer les réactions de transamination dans le métabolisme d'Agaricus bisporus est à rapprocher des exigences alimentaires du champignon, dont le développement optimum est observé à partir de sources d'azote organiques (voir page 64). Toutefois, les ions ammonium permettent d'obtenir une croissance moyenne du mycélium cultivé in vitro sur milieu synthétique ou semi-synthétique. Cette constatation m'a conduit à comparer les activités, d'une part des réactions de transamination, d'autre part de l'un des processus assurant l'utilisation de l'azote ammoniacal, l'amination réductrice. L'existence d'une possibilité de biosynthèse enzymatique d'acide glutamique à partir d'acide α-cétoglutarique et de sulfate d'ammonium et en présence de $NADH_2$, a été démontrée par dosage de l'acide glutamique formé, couplé avec la mesure au spectrophotomètre de l'oxydation du $NADH_2$ (SANDWAL et MADHU LATA, 1964). Dans les conditions expérimentales retenues, le matériel enzymatique étant également constitué par une poudre acétonique, la glutamique déshydrogénase possède une activité environ 100 fois plus faible que la transaminase acide aspartique - acide α-cétoglutarique. Des essais de mise en évidence d'une amination réductrice des acides glyoxylique, pyruvique et hydroxypyruvique ont pour l'instant abouti à des résultats négatifs.

L'évolution de l'activité des différentes transaminases en fonction du phénomène des volées permet de constater la présence d'un optimum pour les carpophores soit de deuxième, soit de troisième volées. Il est intéressant de noter (figure 13) que les échantillons renfermant les teneurs les plus élevées en alanine, acide aspartique (2ème volée), glycocolle et sérine libres (3ème volée) sont également caractérisés par les activités maximales des enzymes catalysant la formation de ces mêmes acides aminés. Cette remarque peut également s'appliquer avec

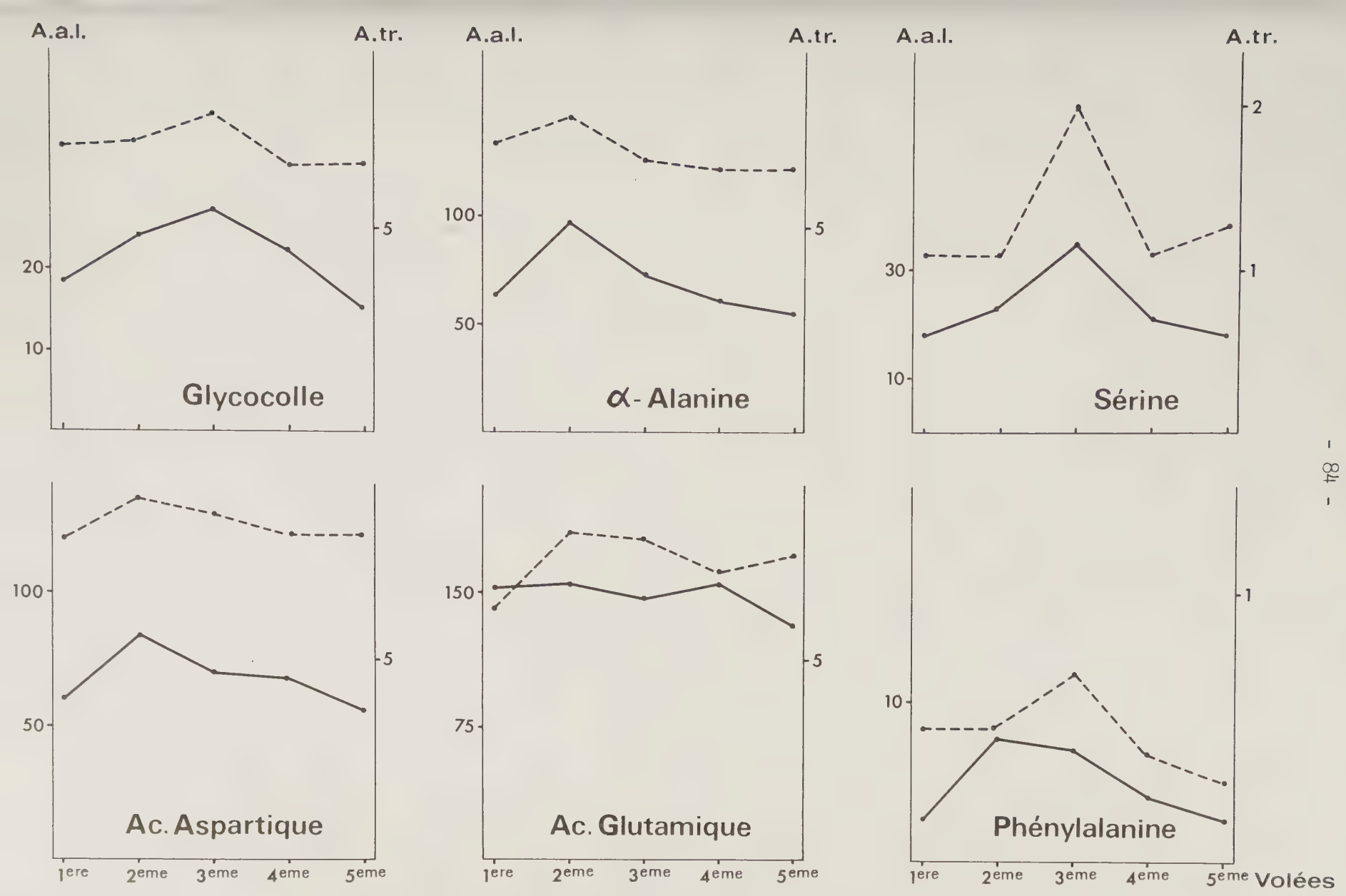


Figure 13 - Acides aminés libres (micromoles par g. de matériel sec)——● et activités des transaminases (micromoles d'acide aminé formé pour 1 millimole de N protéique)●------●, en fonction du phénomène des volées.

quelques réserves au cas de la phénylalanine. Pour certains aminoacides, l'augmentation de leurs teneurs seraient donc explicables, du moins partiellement, par un accroissement de leur biosynthèse par transamination.

Le dosage des acides organiques impliqués dans le cycle de KREBS avait fait ressortir une légère diminution des concentrations en acides succinique, fumarique et malique dans les champignons de troisième volée, cette diminution s'amorçant parfois en deuxième volée. Des restrictions ont été émises par LE ROUX (1966) sur l'importance du cycle des acides tricarboxyliques dans le métabolisme d'Agaricus bisporus. Indépendamment de ces résultats, la participation accrue des acides pyruvique, oxalacétique et α-cétoglutarique aux réactions de transamination pourrait avoir une répercussion sur la formation des autres acides organiques précités et justifier dans une certaine mesure la baisse de leurs concentrations.

D - METABOLISME DE L'ACIDE GLYOXYLIQUE.

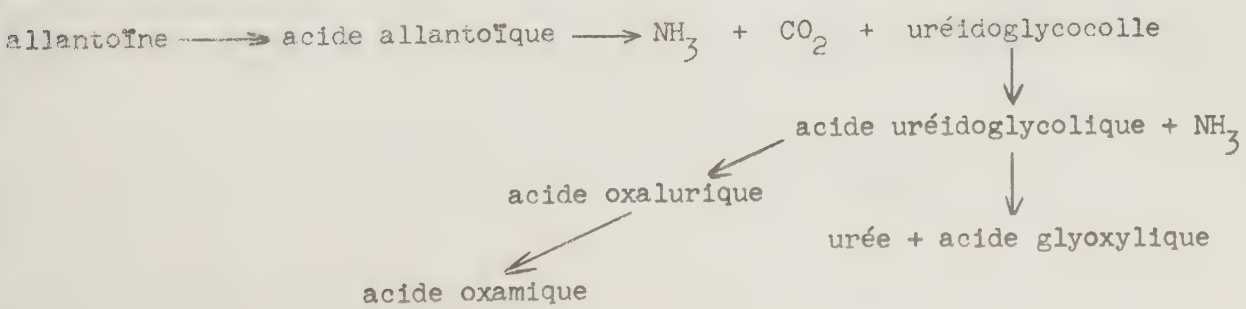
Outre son implication dans des réactions de transamination, l'acide glyoxylique est un métabolite pouvant intervenir dans divers autres processus métaboliques que je rappellerai brièvement.

1 - L'acide glyoxylique constitue tout d'abord un intermédiaire dans la dégradation de l'allantoïne et, plus généralement, des purines. Deux schémas ont été proposés. BRUNEL (1936) a montré chez les champignons l'existence des réactions :

$$\text{allantoïne} \xrightarrow[+\ H_2O]{\text{allantoïnase}} \text{acide allantoïque} \xrightarrow[+\ H_2O]{\text{allantoïcase}} \text{acide glyoxylique} + 2\ \text{urée}$$

BRUNEL et BRUNEL-CAPELLE (1951 a, 1951 b) ont également apporté la preuve de la réversibilité du système acide allantoïque $\rightleftharpoons$ acide glyoxylique + urée chez Agaricus campester et Lycoperdon perlatum.

Selon VOGELS (1953), le catabolisme de l'allantoïne utilisée comme source d'azote par deux bactéries, Arthrobacter allantoïcus et Streptococcus allantoïcus, procèderait selon une deuxième voie :



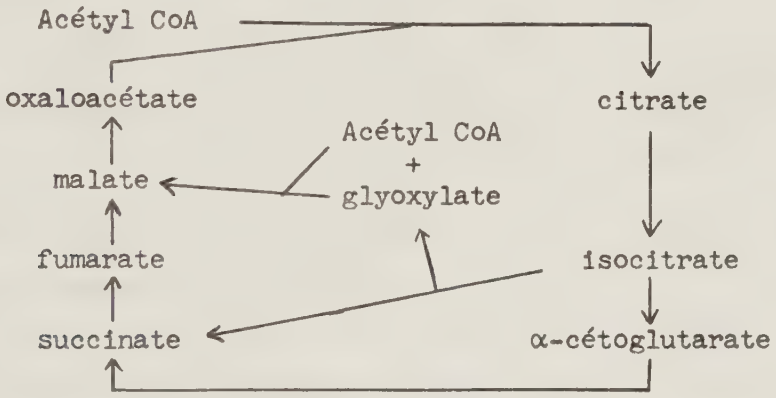
2 - Un autre processus important dans lequel est engagé l'acide glyoxylique est sa condensation avec d'autres chaînons carbonés. KORNBERG et COLLINS (1958) signalent, chez Aspergillus niger, l'utilisation de l'acétate grâce à une enzyme, la malate synthétase :

Acétyl-coenzyme A + glyoxylate $\xrightarrow{\text{malate synthétase}}$ malate.

Le glyoxylate impliqué dans la réaction pourrait provenir de l'isocitrate :

Isocitrate $\xrightarrow{\text{isocitratase}}$ succinate + glyoxylate

Ces deux réactions constituent le cycle du glyoxylate, ''shunt'' du cycle de KREBS (KORNBERG et MADSEN, 1958) :



On s'accorde à attribuer actuellement au cycle du glyoxylate un rôle qui est loin d'être négligeable, surtout dans les végétaux plus particulièrement orientés vers un catabolisme lipidique (KORNBERG et BEEVERS, 1957 ; REEVES et AJL, 1962).

Le clivage du malate en glyoxylate et acétyl-coenzyme A selon les réactions :

malate + A T P + coenzyme A $\rightleftharpoons$ malyl coenzyme A + A D P + Pi

malyl coenzyme A $\rightleftharpoons$ glyoxylate + acétyl coenzyme A

a été caractérisé par TUBOI et KIRUCHI (1962), à partir de Rhodopseudomonas sphéroïdes. Le catalyseur responsable serait différent de la malate-synthétase.

3 - On doit aussi signaler, à côté de ces travaux, les résultats obtenus par KRAKOW et BARKULIS (1956) qui décrivent, chez Escherichia coli, une condensa-

tion de deux molécules d'acide glyoxylique avec libération de CO_2 et formation d'acide hydroxypyruvique ou du semi-aldéhyde tartronique, ces deux isomères n'étant pas distingués. KORNBERG et GOTTO (1961) ont montré qu'une souche de Pseudomonas transformait ensuite la semi-aldéhyde tartronique en acide glycérique, lui-même donnant naissance à de l'acide pyruvique. Ce même schéma est adopté par KRAKOW et coll. (1961).

4 - L'acide glyoxylique se trouve également étroitement lié au métabolisme des acidesglycolique et oxalique. Chez les végétaux supérieurs, KENTEN et MANN (1952) mettent en évidence dans les feuilles de tabac une enzyme, ''l'hydroxy-acid oxidase'', qui agit sur l'acide glycolique et sur l'acide glyoxylique. L'oxydation de l'acide glycolique se ferait suivant la réaction ci-dessous :

$$HOOC - CH_2OH + O_2 \longrightarrow HOOC - CHO + H_2O_2 ,$$

celle de l'acide glyoxylique, plus lente, procèderait selon le schéma :

$$HOOC - CH(OH)_2 + O_2 \longrightarrow HOOC - COOH + H_2O_2 .$$

En l'absence de catalase, l'acide glyoxylique réagit avec l'eau oxygénée pour donner finalement de l'acide formique et du CO_2.

ZELITCH (1953) et ZELITCH et OCHOA (1953) caractérisent et isolent dans les feuilles d'épinard la ''glycolic acid oxidase'' et la ''glyoxylic acid reductase'' qui catalysent respectivement le passage de l'acide glycolique à l'acide glyoxylique + H_2O_2 et la réduction du glyoxylate en glycolate, avec utilisation de $NADH_2$. En 1962, une nouvelle réductase de l'acide glyoxylique, utilisant comme coenzyme le $NADPH_2$, a été isolée par ZELITCH et GOTTO (1962). Le problème ne semble toutefois pas entièrement résolu : RICHARDSON et TOLBERT (1960) montrent que la ''glycolic acid oxidase'', d'origine animale ou végétale, est capable à elle seule de provoquer l'oxydation du glycolate en glyoxylate et celle du glyoxylate en oxalate.

MILLERD, MORTON et WELLS (1963) ont prouvé qu'acides glycolique et glyoxylique étaient les précurseurs directs de l'acide oxalique chez Oxalis pes-caprae et, chez les microorganismes, une utilisation analogue du glycolate a été décrite par FRANKE et coll. (1961) et KORNBERG et SADLER (1961).

5 - Enfin, la dégradation de l'acide glyoxylique par décarboxylation oxydative conduit à l'acide formique. Cette phase ultime du métabolisme a été

montrée par de nombreux auteurs, parmi lesquels on peut mentionner ZELITCH (1953), ZELITCH et OCHOA (1953), CAMPBELL (1955), CHARALAMPOUS (1957).

Le problème de la transformation de l'acide glyoxylique par le champignon de couche a été posé en 1952 : BRUNEL-CAPELLE a mis en évidence que des macérations d'Agaricus campester dégradaient le glyoxylate, cette dégradation étant en partie d'origine enzymatique, en partie d'origine chimique (existant en présence de matériel végétal porté au préalable 30 minutes à 100° C avant l'addition de substrat). Le processus enzymatique est optimal à pH 8,5, il s'effectue avec une vitesse maximale entre 35 et 45° C puis devient inexistant à 65° C et il est partiellement inhibé par de fortes teneurs en acide glyoxylique ; par contre, le phénomène chimique est favorisé par des valeurs supérieures du pH (10,0 - 11,0), par des températures plus élevées et par de hautes concentrations en substrat (BRUNEL-CAPELLE, 1952 ; LATCHE, 1960, 1961). De plus, la faculté de transformer l'acide glyoxylique est loin d'être une propriété spécifique d'Agaricus bisporus ; elle s'étend à un grand nombre de Basidiomycètes appartenant, entre autres, aux genres Amanita, Leucocoprinus, Russula, Boletus, Trachypus (LATCHE, 1962).

La place qu'occupe l'acide glyoxylique dans les bilans en acides cétoniques du champignon de couche a été soulignée (voir page 72). De plus, ce composé participe activement à la biosynthèse de glycocolle mais ne peut accepter les groupements $-NH_2$ que d'un seul aminoacide, l'α-alanine.

Ces différentes constatations, jointes aux rôles variés que peut jouer l'acide glyoxylique, m'ont incité à entreprendre une étude de son métabolisme chez Agaricus bisporus et, plus particulièrement, à préciser l'importance de son utilisation in vivo par transamination comparativement à d'autres voies dans lesquelles il serait éventuellement impliqué.

I - CONDITIONS OPTIMALES D'ACTION DE LA TRANSAMINASE α-ALANINE - ACIDE GLYOXYLIQUE.

L'activité de la transaminase α-alanine-acide glyoxylique peut être appréciée par détermination soit du glycocolle formé, soit de l'acide glyoxylique disparu. La première possibilité a été écartée, par suite de la longueur des manipulations précédant le dosage de l'acide aminé . L'adoption de la seconde éventualité était soumise à une vérification préalable ; la totalité du glyoxylate utilisé in vitro par voie enzymatique devait obligatoirement être impliquée dans la biosynthèse du glycocolle. Ceci, dans les conditions de l'expérience, a été confirmé.

J'ai retenu, pour doser l'acide glyoxylique, la technique colorimètrique de FOSSE, BRUNEL et THOMAS (1931), modifiée par BRUNEL-CAPELLE (1955). Les détails du protocole suivi ont été exposés par ailleurs (LATCHÉ, 1960).

Toutefois, la coexistence du phénomène enzymatique et d'une transformation de nature purement chimique* fausse, dans une certaine mesure, les résultats. La dégradation chimique est observée lorsque le glyoxylate est mis en présence d'une poudre ''brute''(résultant du broyage des carpophores d'Agaric préalablement séchés sous vide), ou d'une macération aqueuse. Elle diminue dans d'assez fortes proportions lorsque le matériel végétal utilisé est une poudre acétonique préparée ainsi qu'il a été décrit précédemment. Cependant, afin de l'éliminer entièrement, une purification partielle du catalyseur a été effectuée.

1 - Purification partielle.

a - Solubilisation du catalyseur ; macération aqueuse. 3 lots de 1 g. de poudre ''brute'' sont mis en contact avec 25 ml d'eau distillée glacée et agités à basse température (environ 4° C) pendant des temps variables : 10 minutes pour le lot I, 20 minutes pour le lot II, 30 minutes pour le lot III. Les suspensions sont centrifugées (10.000 g ; 0° C ; 10 minutes) ; les activités enzymatiques et chimiques des surnageants (prise d'essai : 1 ml) et des culots (prise d'essai : 40 mg, après séchage sous vide et broyage) sont déterminées selon le protocole exposé page 76 , l'α-alanine étant utilisée comme donneur de $-NH_2$. Les résultats permettent de conclure que la totalité de la transaminase passe en solution au bout de 10 minutes d'agitation (lot I) : ces conditions seront ultérieurement retenues pour la préparation des macérations. Par contre, la transformation chimique maximale est enregistrée pour les lots II et III, soit après un contact poudre-eau distillée d'au moins 20 minutes.

b - Précipitation du catalyseur. A partir de macérations aqueuses, trois modes de précipitation ont été envisagés : par le sulfate d'ammonium, par l'éthanol à 96° GL et par l'acétone.

Quelle que soit la concentration en sulfate d'ammonium, le précipité obtenu ne présente, avant ou après dialyse, qu'une activité enzymatique très faible.

---

* L'étude de la cause et du mécanisme de cette transformation chimique n'a pas été abordée dans ce travail. BRUNEL-CAPELLE (1952) a montré qu'elle pouvait être provoquée par certains constituants naturels du végétal, tels que l'acide ascorbique, la cystine, la cystéine et le glutathion.

L'emploi d'alcool éthylique et d'acétone a conduit à des résultats satisfaisants. Le mode opératoire adopté est le suivant. A la macération aqueuse préalablement refroidie (mélange eau-glace-sel), on ajoute goutte à goutte l'éthanol ou l'acétone, la température du mélange ne dépassant jamais - 5° C. Après centrifugation (10.000 g , - 5° C, 15 minutes), la précipité recueilli est séché une nuit sous vide en présence de Cl_2Ca puis réduit en poudre. Son activité est dosée par détermination de l'acide glyoxylique disparu au cours d'un essai renfermant 10 mg de précipité, 80 micromoles de glyoxylate de sodium, 160 micromoles d'α-alanine, 20 microgrammes de pyridoxal-5-phosphate, 2 ml d'H_2O et 2 ml de tampon d'ATKINS et PANTIN, pH 8,5 ; la durée de l'incubation à 38° C est de 15 minutes. Différents témoins ont permis de vérifier que les précipités alcoolique ou acétonique ne provoquaient aucune transformation chimique de l'acide glyoxylique, dont la disparition est entièrement redevable du processus enzymatique de transamination.

Le tableau XXIX permet de préciser la concentration optimale en agent de précipitation.

TABLEAU XXIX

Précipitation par l'alcool et l'acétone, de la transaminase α-alanine-acide glyoxylique

Concentrations en éthanol à 96° G.L. ou en acétone (en % du volume initial de la macération aqueuse)	Activité enzymatique (µM de substrat transformé/10 mg de précipité)	
	Précipité éthanolique	Précipité acétonique
0 - 25 %	0	0
25 - 45 %	1, 9	12,6
45 - 60 %	9, 0	0,2
60 - 80 %	0	0

On remarque que l'utilisation d'acétone conduit à des formations de glycocolle légèrement supérieures. Une constatation analogue avait été effectuée par

FRANKE, JILGE et EICHHORN (1961) à propos de la transaminase alanine-acide glyoxylique d'Aspergillus niger, qui précipite pour des teneurs en acétone comprises entre 45 et 70 %. Dans le cas d'Agaricus bisporus, la précipitation du catalyseur est réalisée à des concentrations inférieures : 25 à 45 %. Le matériel préparé selon ces données a été retenu pour l'étude des conditions optimales d'action de l'enzyme. Son activité (acide glyoxylique dégradé en une minute par une quantité de matériel renfermant 1 millimole d'azote protéique) est en moyenne 10 fois plus élevée que l'activité d'une poudre acétonique préparéeselon REINBOTHE (1964). Cette préparation catalyse également la synthèse de l'acide glutamique à partir d'acide α-cétoglutarique et d'acide aspartique ; par contre, l'intensité des autres processus de transamination est fortement diminuée ou nulle.

2 - Détermination des conditions optimales d'action.

Pour les différents essais, la quantité de précipité est de 10 mg et la durée d'incubation de 15 minutes : dans ces conditions, il y a proportionnalité directe entre l'activité enzymatique d'une part, la concentration en catalyseur et le temps d'action d'autre part.

a - pH optimum

Glyoxylate de sodium	80 µmoles
α-alanine	160 µmoles
Pyridoxal-5-phosphate	20 µgrammes
Tampon d'ATKINS et PANTIN, pH variable (7,5 à 11) ou Tampon phosphate de SÖRENSEN, pH variable (6 à 7,5)	2 ml
Eau distillée	2 ml
Température	38° C

L'examen de la figure 14 a montre que la transformation enzymatique de l'acide glyoxylique débute à un pH inférieur à 6, passe par un maximum à pH 8,5, puis décroît et disparaît pratiquement si le pH est supérieur à 11.

Dans le mélange tampon d'ATKINS et PANTIN, la présence d'acide borique, connu pour inhiber certaines enzymes, n'a pas d'influence néfaste sur le déroulement de la réaction : des essais, dans lesquels ont été utilisés les tampons Tris (trihydroxyméthylaminométhane 0,2 M - HCl 0,2 N), de SÖRENSEN ($PO_4 H_2 K$ M/15 - $PO_4 HNa_2$ M/15) ou de MICHAELIS (barbital M/10 - HCl N/10), ont abouti à la mise en évidence de formations de glycocolle identiques à celles observées en employant le tampon d'ATKINS et PANTIN.

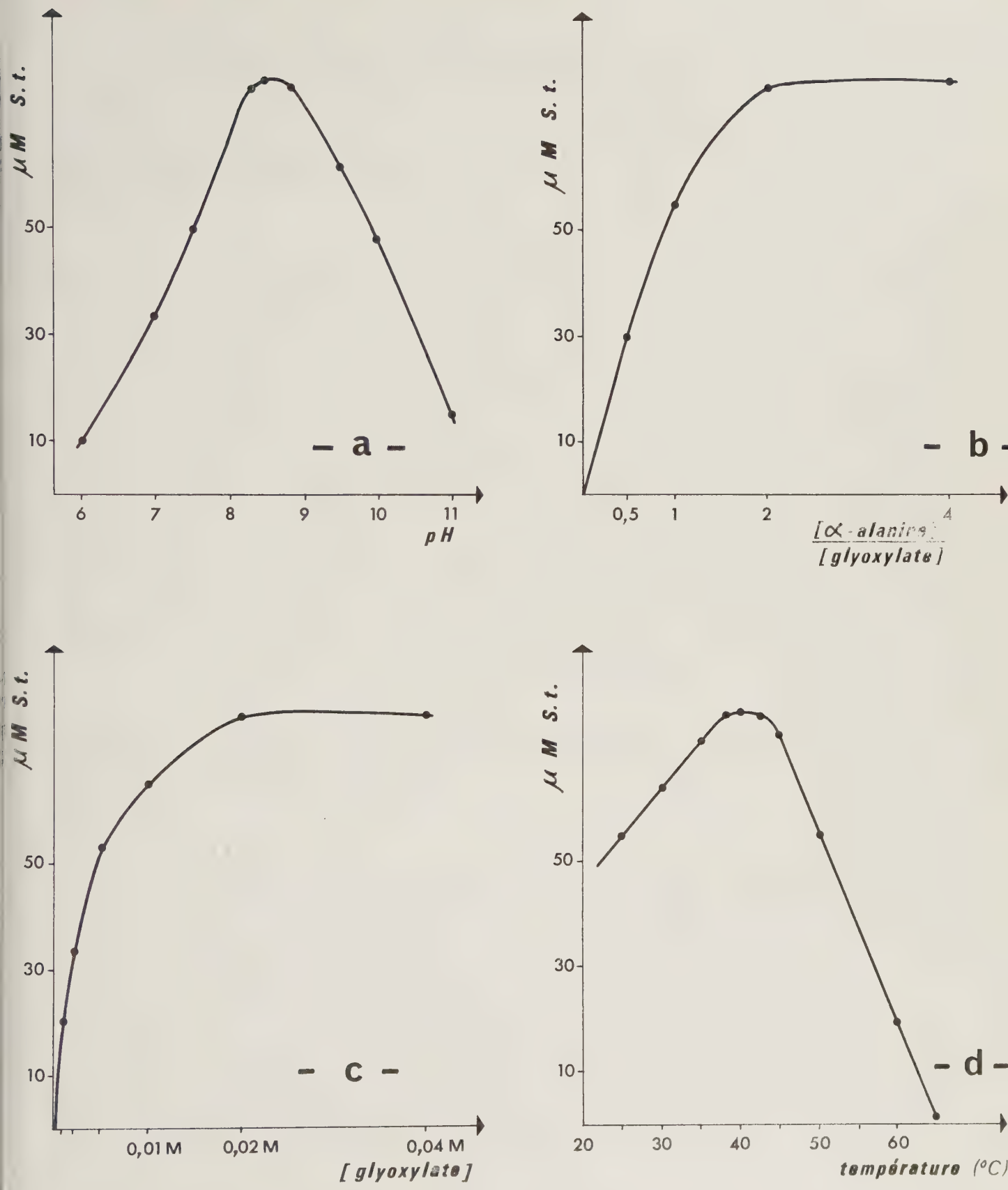


Figure 14 - Conditions optimales d'action de la transaminase α-alanine-acide glyoxylique (substrat transformé en micromoles/1 millimole de N protéique/minute).

b - Influence de la concentration en α-alanine.

Glyoxylate de sodium	80 µmoles
α-Alanine	concentration variable
Pyridoxal-5-phosphate	20 µgrammes
Tampon d'ATKINS et PANTIN, pH 8,5	2 ml
Eau distillée	2 ml
Température	38°C

Il ressort de la courbe 14 b que la biosynthèse de glycine est maximale à partir de quantités d'α-alanine doubles de celles de glyoxylate. Je n'ai trouvé, dans la littérature scientifique, que peu de renseignements se rapportant à l'influence, sur les transaminations, du rapport des concentrations en donneur et en accepteur des groupements $-NH_2$. Dans la plupart des protocoles expérimentaux, la valeur retenue pour ce rapport est égale à 1 (SANDWALL, ZINK et DIN, 1964). Toutefois, dans des études sur les transaminases conduisant à la formation d'acides aminés aromatiques (GAMBORG et WETTER, 1963 ; SINHA, SIROHI et ABROL, 1967) ou au transfert du groupement amino de l'ornithine à divers cétoacides (KATANUMA, MATSUDA et TOMINO, 1964), les essais enzymatiques contiennent des teneurs 2 ou 2,5 fois moins fortes en acide cétonique qu'en acide aminé. Ces données sont à mettre en parallèle avec les constatations effectuées au cours de ce travail.

c - Influence de la concentration en glyoxylate.

Glyoxylate de sodium, concentration variable	
α-Alanine, concentration double de celle en glyoxylate	
Pyridoxal-5-phosphate	20 µgrammes
Tampon d'ATKINS et PANTIN, pH 8,5	2 ml
Eau distillée	2 ml
Température	38° C

L'activité transaminasique (figure 14 c) augmente en fonction de la teneur en glyoxylate du milieu, puis tend à devenir constante pour des concentrations en substrat égales ou supérieures à 0,02 M. Il est possible d'assimiler la courbe obtenue aux courbes classiques d'activités enzymatiques. Des concentrations élevées en acide glyoxylique ne possèdent pas un effet inhibiteur sur la réaction, contrairement à ce qui avait été trouvé précédemment (IATCHÉ, 1960). Dans ce dernier cas, il a été démontré que l'utilisation d'un matériel provoquant également une transformation chimique du glyoxylate faussait l'appréciation exacte du phénomène enzymatique et conduisait à des résultats erronés.

d - Etude de la réaction en fonction de la température.

Glyoxylate de sodium	80 µmoles
α-Alanine	160 µmoles
Pyridoxal-5-phosphate	20 µgrammes
Tampon d'ATKINS et PANTIN, pH 8,5	2 ml
Eau distillée	2 ml
Température	variable

La transformation enzymatique de l'acide glyoxylique est optimale pour des températures comprises entre 37 et 43° C, puis elle décroît assez rapidement (figure 14 d). A 65° C, elle est pratiquement nulle. Dans certains cas, le substrat et le pyridoxal-5-phosphate assurent une protection efficace contre l'inactivation thermique (HAYASHI et coll., 1967). La transaminase alanine-acide glyoxylique d'Agaricus bisporus, portée pendant 30 minutes à 68° C, soit seule, soit en présence de glyoxylate ou de pyridoxal, perd toute activité.

e - Influence de la concentration en pyridoxal-5-phosphate.

Glyoxylate de sodium	80 µmoles
α-Alanine	160 µmoles
Pyridoxal-5-phosphate	concentration variable
Tampon d'ATKINS et PANTIN, pH 8,5	2 ml
Eau distillée	2 ml
Température	38° C

L'influence de la concentration en pyridoxal-5-phosphate sur l'activité de la transaminase α-alanine - acide glyoxylique est précisée dans le tableau XXX.

TABLEAU XXX

Influence de la concentration en pyridoxal-5-phosphate

Quantité de pyridoxal-5-phosphate ajouté, en µg/essai	Acide glyoxylique transformé par minute en µM/1 mM de N protéique
0	57,6
10	77,5
20	78,1
40	78,1

Les transaminases diffèrent par la fermeté avec laquelle le cofacteur est lié à l'apoenzyme (GUIRARD et SNELL, 1964) ; toutefois, on observe généralement une perte partielle du coenzyme au cours des opérations de purification. Dans le cas présent, l'addition de pyridoxal-5-phosphate augmente d'environ 25 % l'activité de la transaminase α-alanine - acide glyoxylique d'Agaricus bisporus. Par contre, quelle que soit la quantité de pyridoxal ajoutée (10, 20 ou 40 µgrammes), les activités enzymatiques sont pratiquement identiques.

3 - Spécificité de la L-α-alanine comme donneur de $-NH_2$.

J'ai signalé antérieurement que, parmi différents donneurs de groupements amino envisagés (ornithine, lysine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, α-alanine, acide γ-aminobutyrique, valine, sérine, proline, asparagine et glutamine), seule la L-α-alanine conduisait à la formation de glycocolle. Ceci a été confirmé en utilisant le précipité acétonique comme matériel enzymatique. De plus, l'acide glyoxylique ne peut accepter les groupements $-NH_2$ de la D-α-alanine, ni de la β-alanine.

La mise en évidence de biosynthèse de glycine par transamination dans divers carpophores de Basidiomycètes m'a amené à vérifier si cette spécificité de l'α-alanine se retrouvait ailleurs que chez Agaricus bisporus. Trois espèces, choisies parmi celles qui avaient été reconnues pour provoquer les transformations enzymatiques de l'acide glyoxylique les plus élevées (LATCHÉ, 1962), ont été retenues : Leucocoprinus procerus (Fr. ex Scop.) Pat., Trachypus aurantiacus (Bull.) Roq. et Boletus edulis Bull. ex Fr.. Le matériel végétal est constitué par 50 mg de poudre obtenue par broyage des carpophores préalablement séchés sous vide, en présence de chlorure de calcium, pendant 48 heures. L'essai E renferme en outre 1 ml de glyoxylate de sodium 0,01 M, 1 ml de tampon d'ATKINS et PANTIN, 20 µgrammes de pyridoxal-5-phosphate et 1 goutte de toluène. Aucun donneur de $-NH_2$ exogène n'a été rajouté, ce rôle étant joué par les composés azotés solubles apportés par le végétal. Dans le témoin T, de même composition que E, le matériel enzymatique a été porté au préalable 30 minutes à 100° C. Après 1 heure d'incubation à 38° C et défécation à l'acide métaphosphorique, les acides aminés sont dosés à l' ''Amino acid analyzer'' Beckman. Les différences de teneurs en aminoacides entre E et T, exprimées en micromoles par gramme de végétal sec, figurent dans le tableau XXXI.

TABLEAU XXXI

Transamination de l'acide glyoxylique chez quelques Basidiomycètes

Acides aminés (en µM/g. de végétal sec)	Leucocoprinus procerus	Trachypus aurantiacus	Boletus edulis
Glycocolle	+ 153,5	+ 86,4	+ 60,4
α-Alanine	- 122,4	- 58,2	- 58,2
Acide glutamique	- 15,3	- 10,1	-
Glutamine	- 22,9	- 20,0	-

Chez Boletus edulis, la formation, par transamination, de glycocolle s'accompagne de la disparition d'une quantité équivalente d'α-alanine. Par contre, si ce dernier aminoacide reste la principale source de $-NH_2$ dans les carpophores de Leucocoprinus procerus et de Trachypus aurantiacus, on remarque que l'acide glutamique et la glutamine jouent également, mais dans de plus faibles proportions, le rôle de donneurs de groupements amino. Une constatation analogue a été effectuée par PIQUEMAL (1970) pour le mycélium d'Agaricus bisporus cultivé in vitro sur milieu semi-synthétique dont l'acide glutamique constituait la source d'azote.

II - UTILISATION IN VIVO DU GLYOXYIATE 1-2 ^{14}C DANS LES CARPOPHORES D'Agaricus bisporus.

1 - Protocole expérimental.

On constitue quatre lots, comprenant chacun trois carpophores (champignons de troisième volée récoltés au stade II, d'un poids frais moyen de 7,5 g.). A l'aide d'une seringue micrométrique, on injecte à chaque carpophore 0,5 ml d'une solution renfermant, par millilitre, 20 micromoles de glyoxylate de sodium et 1,8 micromole d'acide glyoxylique 1-2 ^{14}C (provenance : Calbiochem ; activité spécifique : 2,78 microcuries/micromole), conférant au mélange une radioactivité de 5 microcuries par millilitre. Les injections sont effectuées en une douzaine de points : 4 à 5 dans le chapeau, 2 à 3 à la base du chapeau, à son point de jonction avec le stipe, 4 enfin dans le stipe lui-même. Les champignons dont le stipe est engagé dans un tube court contenant du coton humidifié à l'eau distillée, sont alors

placés dans une enceinte conditionnée (température : 24° C ; hygrométrie 70-80 % de saturation), pendant des durées variables : 1 heure (Lot I), 2 heures (Lot II), 4 heures (Lot III), 8 heures (Lot IV).

a - Extraction des composés solubles.

Au terme du temps de métabolisme retenu, les échantillons sont fixés pendant 10 minutes à l'azote liquide. Un mélange hydro-éthanolique a été adopté comme solvant d'extraction des composés solubles, de préférence à l'acide trichloracétique dont la présence aurait perturbé l'analyse ultérieure de la fraction acides organiques. Le protocole suivi est décrit dans le tableau XXXII.

Les surnageants S_1, S_2, S_3, S_4 et S_5 sont réunis. Après élimination de l'éthanol par distillation sous pression réduite, les substances électropositives sont séparées par passage de l'extrait global sur une colonne de résine Dowex 50, 50-100 mesh, forme H^+ et élution par l'ammoniaque N, puis 2 N.

Les composés électronégatifs (ac. organiques) sont retenus sur résine Dowex 2, 200-400 mesh, forme carbonate. Ils sont élués au carbonate d'ammonium 0,5 M, puis à la soude N (BOVÉ, BOVÉ et RAVEUX, 1957) ; le carbonate d'ammonium est éliminé par distillation, à 30-35° C, et un traitement par la résine Dowex 50, forme H^+, permet de fixer les cations.

L'effluent de la colonne de résine anionique renferme les substances neutres.

b - Techniques d'analyse chromatographique sur papier.

Les systèmes de solvants utilisés pour l'étude des acides aminés solubles, ou libérés par hydrolyse du culot, ont été précisés antérieurement. Les acides organiques sont séparés sur papier Whatman n° 1 par emploi des mélanges éthanol-ammoniaque-eau (80-5-15) et n-propanol-benzoate de méthyle-acide formique (70-30-20), respectivement en première et seconde dimensions. Les sucres sont enfin caractérisés par chromatographie descendante monodimensionnelle sur papier Whatman n° 3, à l'aide du solvant n-butanol-acide acétique-eau (50-25-25).

c - Mesures de radioactivité.

Les taches radioactives sont repérées par autoradiographie sur film Kodak ''Kodirex'', le temps de contact entre film et chromatogramme étant fixé à 5 semaines. La radioactivité des différents composés est évaluée à l'aide d'un détecteur à scintillation en milieu semi-liquide pour rayonnement β de basse énergie (dispositif ROUCAYROL, OBERHAUSEN, SCHÜSSLER).

TABLEAU XXXII

Protocole d'extraction des composés solubles

Carpophores broyés, après fixation par l'azote liquide, dans 100 ml d'éthanol à 96° G.L. (Omnimixer Sorvall, température : 0 à + 5° C)

↓

Addition d'eau distillée de façon à amener la teneur en éthanol à 60° G.L. - Agitation à température ≠ 0° C (eau-glace-sel) : 30 minutes

↓

Centrifugation : 10.000 g, - 5° C, 10 minutes

↙ Culot

↘ Surnageant S_1

↓

3 épuisements du culot, les 2 premiers par 50 ml d'éthanol à 60° G.L., le dernier par l'eau distillée. Température ≠ 0° C.

Centrifugations → Surnageants S_2, S_3, S_4

↓

Culot : environ 2,5 g. (poids frais)

↙ 500 mg séchés sous vide sur Cl_2Ca en vue d'une étude des aminoacides de la fraction insoluble, après hydrolyse acide (HCl 6 N, 105° C, 40 heures).

↘ Reste du culot mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée et addition de Dowex 50, forme H^+, jusqu'à pH acide

↓

extraction (1) par agitation à température ≠ 0° C : 2 heures

↓

Centrifugation : 10.000 g, - 5° C, 10 minutes

↳ Surnageant S_5

(1) La quasi-totalité des composés solubles se retrouve dans les surnageants S_1, S_2, S_3 et S_4. L'extraction par l'eau additionnée de Dowex 50 a pour but de faire passer en solution des acides organiques éventuellement présents dans le végétal sous forme insoluble, sels de Ca par exemple (ROUX et LESAINT, 1959).

2 - Résultats.

SINHA et COSSINS (1965) ont souligné la rapidité avec laquelle le glyoxylate est métabolisé par différents tissus végétaux (carotte, cotylédons, feuilles et racines de pois, coléoptiles de blé). Une remarque identique à été effectuée dans le cas des carpophores d'Agaric : au bout d'une heure de métabolisme, il ne reste plus que 60 % du substrat initial et sa transformation est à peu près totale dans le lot II.

Les composés marqués figurent dans les tableaux XXXIII et XXXIV. Leur radioactivité est exprimée, pour chaque lot, en milliers d'impulsions par minute. Le signe + correspond aux taches dont le marquage a été révélé par autoradiographie mais qui est trop faible pour être chiffré.

a - Acides aminés et amides (tableau XXXIII).

- En premier lieu, on obtient la confirmation de l'existence d'une transamination active de l'acide glyoxylique. Cette voie métabolique s'affirme comme étant, in vivo, nettement prépondérante.

TABLEAU XXXIII

Composés radioactifs formés à partir d'acide glyoxylique 1-2 ^{14}C : acides aminés et amides (10^3 i.p.m.).

Composés marqués	Durée de métabolisme			
	1 heure Lot I	2 heures Lot II	4 heures Lot III	8 heures Lot IV
I - Acides aminés et amides libres				
Glycocolle	280	463	408	186
Sérine	110	195	400	540
Acide cystéique	45	50	45	30
Cystathionine	+	+	+	35
Cystine	+	+	+	+
Acide aspartique	-	+	+	+
'' glutamique	-	+	+	42
Alanine	-	+	+	32
Urée	51	62	50	40
Ethanolamine	-	-	-	30
II - Acides aminés des protéines				
Glycocolle	-	+	59	176
Sérine	-	+	64	188

- Le glycocolle donne naissance à la sérine, comme le montre l'évolution du marquage de ces corps en fonction du temps (figure 15). Malgré le rôle important que cette conversion paraît jouer, aucune étude de son mécanisme intime n'a été entreprise au cours de ce travail.

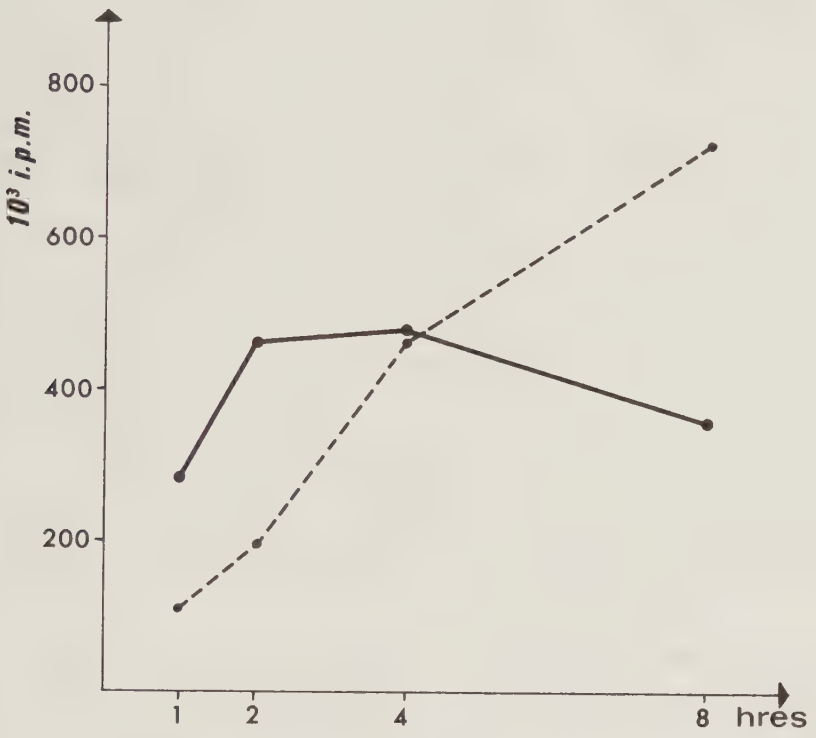


Figure 15 - Cinétique du marquage, en milliers d'impulsions par minute, du glycocolle ——— et de la sérine - - - - -, en fonction du temps de métabolisme.

- L'introduction dans les protéines de glycine et de sérine radioactives apparaît nettement après 8 heures de métabolisme (Lot IV).

- L'acide cystéique, la cystathionine et la cystine ont été identifiés par co-chromatographie et révélation spécifique par le réactif au iodoplatinate (LEDERER, 1960). La cystine provient vraisemblablement de la

transformation de la cystéine au cours du traitement du liquide d'extraction par la résine Dowex 50. Les acides aminés soufrés ont été caractérisés en faibles quantités dans les carpophores d'Agaricus bisporus (voir page 27). Le schéma suivant pourrait rendre compte de leur origine, à partir de la chaîne carbonée de la sérine (DU VIGNEAUD et coll., 1942 ; BOULANGER, 1954 ; MEISTER, 1965) :

Sérine + Homocystéine ⟶ Cystathionine ⟶ { Composé à 4 carbones + Cystéine ⟶ Acide cystéique

Il convient toutefois de noter que l'acide cystéique est marqué au bout d'une heure de métabolisme ; par contre, la radioactivité de la cystathionine n'est mesurable qu'après un temps beaucoup plus long (Lot IV) et celle de la cystine est toujours minime. Si l'on doit retenir pour justifier leur formation l'hypothèse précédente, il faut admettre que la cystéine et, à un degré moindre, la cystathionine sont des substances transitoires, transformées dans le champignon de couche dès leur apparition.

- L'éthanolamine proviendrait également d'une transformation de la sérine (MEISTER, 1965). L'existence d'alanine, acide aspartique et acide glutamique radioactifs s'explique vraisemblablement par transamination des acides cétoniques correspondants.

- Enfin, la mise en évidence d'urée marquée est à rapprocher des observations de REINBOTHE et TSCHIERSCH (1962). Selon ces auteurs, la dégradation, dans les carpophores d'Agaric, de glycocolle 1-^{14}C et 2-^{14}C aboutirait à la libération de $^{14}CO_2$, le gaz carbonique étant ensuite incorporé dans la molécule d'urée par l'intermédiaire du cycle de KREBS et HENSELEIT.

b - Acides organiques.

Comparativement à celle des acides aminés, la radioactivité des acides organiques est nettement inférieure (Tableau XXXIV).

Ces résultats appellent les remarques suivantes :

- L'acide oxalique constitue l'acide organique le plus radioactif et son marquage, maximum après deux heures de métabolisme, diminue fortement au bout de 8 heures. Son origine, à partir du glyoxylate, nécessiterait dans le champignon de couche la présence d'une oxydase analogue à celle qui a été mise en évidence chez d'autres végétaux. Le rôle que joue l'acide oxalique dans la physiologie d'Agaricus bisporus pose certains problèmes. Ce composé a été signalé dans les

TABLEAU XXXIV

Composés radioactifs formés à partir d'acide glyoxylique 1-2^{14}C : acides organiques.(10^3 i.p.m.).

Composés marqués	Durée de métabolisme			
	1 heure Lot I	2 heures Lot II	4 heures Lot III	8 heures Lot IV
Acide oxalique	31	50	44	15
'' glycolique	+	+	+	+
'' succinique	-	-	-	3
'' fumarique	-	-	-	4
'' malique	11	15	18	26
'' citrique	-	4	5	6
'' tartrique	5	8	8	4
'' allantoïque	-	+	+	+
Composé non identifié X	7	9	6	+

carpophores aux premiers stades de leur développement et il disparaît ensuite dans les champignons plus âgés (LE ROUX, 1966). En outre, la croissance du mycélium, aussi bien sur milieu semi-synthétique à base de glucose et d'acide glutamique (PIQUEMAL, 1970), que sur compost dans les conditions de culture en champignonnière (TSU-NING TSAO, 1963), s'accompagne de la production de quantités importantes d'acide oxalique.

- La caractérisation d'acide malique marqué dès le lot I (1 heure de métabolisme) suggère l'existence, chez Agaricus bisporus, de malate-synthétase. Ce fait mériterait une confirmation ultérieure, quoique l'importance de cette réaction métabolique paraisse quantitativement limitée. Une deuxième éventualité paraissait également possible : l'acide glyoxylique peut être dégradé en gaz carbonique, ce dernier par réactions de β-carboxylation aboutissant à la formation d'acide malique. Cette hypothèse paraît devoir être écartée à la suite des travaux de LE ROUX (1966). Cet auteur a montré que l'assimilation de $^{14}CO_2$ par le champignon de couche se traduisait par une formation d'acide malique mais surtout d'acide aspartique ; or, ce dernier composé est toujours très faiblement radioactif lorsque le glyoxylate constitue la source de ^{14}C.

L'entrée de l'acide malique, dans le cycle de KREBS, expliquerait la radioactivité, peu élevée, des acides citrique, succinique et fumarique, de même que des acides α-cétoglutarique et oxalacétique dont la transamination a conduit aux acides aminés correspondants.

- On doit signaler en outre que les acides glycolique, tartrique et allantoïque renferment des traces de radioactivité. Des relations métaboliques entre les acides tartrique, hydroxypyruvique et glyoxylique ont été démontrées (STAFFORD, 1957). L'incorporation du ^{14}C dans l'acide allantoïque est conforme aux résultats de BRUNEL et BRUNEL-CAPELLE (1951 a, 1951 b), mettant en évidence, chez Agaricus campester, la synthèse d'allantoate à partir d'urée et de glyoxylate.

- Des essais d'identification du composé inconnu X, qui dans la fixation sur résine, se comporte comme un acide organique, n'ont abouti à aucun résultat positif. Ce corps occupe sur les chromatogrammes la même position que l'acide shikimique. L'emploi de révélateurs particuliers (FERRAZ et RELVAS, 1961) n'a apporté aucun renseignement ni aucune confirmation supplémentaires.

E - CONCLUSIONS.

La présence, dans les carpophores d'Agaricus bisporus, des acides glyoxylique, pyruvique et α-cétoglutarique avait été précédemment rapportée par LE ROUX (1966). Par contre, à ma connaissance, l'existence des acides hydroxypyruvique, oxalacétique, phénylpyruvique et α-céto-ε-aminocaproïque, n'avait jamais été mentionnée.

Tous ces cétoacides peuvent conduire par transamination à la synthèse d'acides aminés et ces processus jouent un rôle important dans le métabolisme azoté du champignon de couche. Les formations de glycocolle, d'alanine et des acides aspartique et glutamique sont quantitativement les plus élevées.

L'acide glutamique occupe dans ces transferts d'azote une place prépondérante puisqu'il constitue, dans la majorité des cas, le donneur préférentiel des groupements amino. Ce composé, qui existe d'ailleurs en quantité notable dans le compost, paraît donc être un aliment azoté de choix à la fois durant la croissance végétative du mycélium (PIQUEMAL, 1970) et le développement du carpophore. Toutefois, la biosynthèse de glycocolle n'est possible que si l'α-alanine se trouve être la source de radicaux $-NH_2$. Cette remarque, effectuée à propos d'Agaricus bisporus, est également valable pour les fructifications d'autres champignons Basidiomycètes. L'étude du métabolisme du glyoxylate 1-2 ^{14}C a abouti en outre à la mise en évidence d'une intense formation de sérine à partir du glycocolle. Comparativement à la transaminase acide glutamique-acide hydroxypyruvique, cette interconversion glycine-sérine est apparemment beaucoup plus importante.

Des variations d'activités enzymatiques ont été constatées dans les échantillons issus des poussées successives d'une même culture. C'est ainsi que les transaminases donnant naissance à la glycine, l'alanine, la sérine, l'acide aspartique et la phénylalanine possèdent une activité accrue dans les volées où ces aminoacides ont été caractérisés, à l'état libre, en plus grandes quantités. Il est donc permis d'effectuer une liaison entre ces deux faits et de rendre les processus enzymatiques de synthèse responsables, tout au moins partiellement, des augmentations des teneurs en acides aminés précités. Je me propose, dans la suite de ce travail, de vérifier si cette même hypothèse peut également s'appliquer à la proline et à l'arginine dont les concentrations passent par un maximum dans les carpophores de troisième volée.

QUATRIEME PARTIE

METABOLISME DE L'ARGININE ET DE IA PROLINE

A - TECHNIQUES UTILISEES.

I - Techniques liées à l'emploi des molécules marquées au ^{14}C.

II - Techniques enzymologiques.

B - CATABOLISME DE L'ARGININE U-^{14}C ET GUANIDO-^{14}C.

I - Utilisation de la DL-Arginine U^{14}C.

II - Identification du composé X : catabolisme de la L-arginine guanido-^{14}C.

III - Discussion.

C - DEGRADATION DE L'ARGININE EN ORNITHINE ET UREE : ETUDE DE L'ARGINASE.

I - Conditions optimales d'action.

1 - Protocole d'étude.

2 - Résultats.

II - Influence des ions Mn^{++} sur l'activité arginasique.

III - Activité arginasique en fonction du phénomène des volées.

D - DESAMINATION OXYDATIVE DE L'ARGININE : MISE EN EVIDENCE DE L'ENZYME.

I - Mode opératoire.

1 - Matériel végétal.

2 - Composition des essais et témoins.

II - Résultats.

E - CATABOLISME DE IA PROLINE U- ^{14}C.

F - UTILISATION, IN VIVO DE D-L ACIDE GLUTAMIQUE 3-4 ^{14}C.

I - Principaux composés marqués.

1 - Répartition de la radioactivité dans les différentes fractions.

2 - Composés azotés libres et protéiques.

3 - Acides organiques marqués.

4 - Composés neutres.

II - Devenir de l'acide γ-aminobutyrique.

1 - Utilisation de l'acide γ-aminobutyrique par des coupes de tissus frais.

2 - Essais de mise en évidence in vitro de la semi-aldéhyde déshydrogénase.

G - ETUDE DE L'ORNITHINE TRANSCARBAMYLASE ET DE L'ARGININE SYNTHETASE.

I - Protocole expérimental.

1 - Choix du matériel enzymatique.

2 - Composition des milieux réactionnels. Techniques de dosage.

II - Activités enzymatiques.

H - CONCLUSIONS.

METABOLISME DE L'ARGININE ET DE LA PROLINE

L'accumulation d'arginine et de proline dans les carpophores de troisième volée pouvait avoir pour origine soit un défaut d'utilisation, soit un accroissement de leur synthèse. Ces deux possibilités ont été tour à tour envisagées : le métabolisme de l'arginine a toutefois fait l'objet d'un examen plus approfondi que celui de la proline. Au cours de ce travail, l'emploi de molécules marquées au ^{14}C m'a d'abord permis d'examiner le déroulement in vivo des processus physiologiques et de formuler ainsi certaines hypothèses. Je me suis ensuite efforcé, toutes les fois que cela m'a été possible, de confirmer ces premières constatations par une étude enzymatique in vitro.

J'exposerai successivement les résultats obtenus sur le catabolisme de l'arginine et de la proline, puis sur leur anabolisme à partir d'un précurseur commun, l'acide glutamique.

A - TECHNIQUES UTILISEES.

I - TECHNIQUES LIEES A L'EMPLOI DES MOLECULES MARQUEES AU ^{14}C.

L'essentiel de ces techniques a été exposé à propos des expériences portant sur le métabolisme du glyoxylate 1-2 ^{14}C (pages 96-99). Cependant, les modifications suivantes ont été apportées au protocole expérimental précédemment décrit :

- Les champignons ont été cultivés en pots (voir page 6) et la substance radioactive leur a été administrée in situ, sans qu'ils soient arrachés du compost. Le composé étudié est ainsi métabolisé par des carpophores laissés dans leurs conditions normales de culture.

- Les échantillons ont été choisis à un état de développement intermédiaire entre les stades I et II définis au début de ce travail. Ceci permettait d'expérimenter sur des organismes jeunes et en voie de croissance active.

- Les molécules marquées (arginine U-^{14}C, arginine guanido-^{14}C, proline U-^{14}C et acide glutamique 3-4-^{14}C) proviennent du Commissariat à l'Energie atomique. Leur pureté a toujours été contrôlée, avant emploi, par autoradiographie. Par addition d'entraîneur inerte (origine : Calbiochem), on prépare pour chacun des compo-

sés, une solution aqueuse, ajustée s'il y a lieu à pH 7, et dont la concentration et la radioactivité sont respectivement de 5 micromoles et de 33 microcuries par millilitre. On injecte, à chaque carpophore, 250 microlitres de cette solution ; une même expérience porte au minimum sur 3 carpophores.

- L'utilisation d'un dispositif analogue à celui décrit par LE ROUX (1966) permet de capter le gaz carbonique dégagé. Le CO_2 est recueilli dans une solution de soude 0,5 N et le carbonate ainsi formé est ensuite insolubilisé par addition d'une solution de chlorure de baryum 0,5 M préparé dans du chlorure d'ammonium de même molarité. Le précipité de carbonate de baryum, récupéré par filtration, est desséché pendant 2 heures à 90° C et réduit en poudre.

- La radioactivité du carbonate de baryum et, après extraction éthanolique et traitements par échangeurs d'ions, celle des fractions cationique, anionique, neutre et protéique est déterminée au compteur Geiger-Muller.

Chromatographie, autoradiographie et mesure au détecteur à scintillation en milieu semi-liquide permettent enfin d'évaluer, à l'intérieur de chaque fraction, le marquage des différents composés.

II - TECHNIQUES ENZYMOLOGIQUES.

Les principales enzymes étudiées sont : l'arginase, la L-aminoacide oxydase responsable de la désamination oxydative de l'arginine, l'ornithine transcarbamylase et l'arginine synthétase. Les modes opératoires adoptés seront développés dans les paragraphes consacrés à chacune de ces enzymes.

B - CATABOLISME DE L'ARGININE U-^{14}C ET GUANIDO-^{14}C.

I - UTILISATION DE IA D-L ARGININE U-^{14}C.

De l'arginine uniformément marquée a été fournie à des carpophores de première, troisième et cinquième volées. Dans chaque cas, la durée des expériences a été fixée à 2 et 6 heures.

Le tableau XXXV rend compte de la répartition de la radioactivité retrouvée dans les diverses fractions.

Le gaz carbonique, les acides organiques et les composés neutres n'occupent dans ce bilan qu'une part minime. Les principaux acides organiques marqués sont les acides malique, succinique, fumarique, citrique et pyrrolidone carboxyli-

TABLEAU XXXV

Répartition de la radioactivité dans les différentes fractions (en % de la radioactivité totale)

	1ère volée		3ème volée		5ème volée	
	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures
Gaz carbonique	0,2	1,4	0,3	4,5	0,3	3,5
Composés azotés libres	89,0	79,0	85,7	70,4	88,0	73,9
Acides organiques	0,3	0,9	0,3	0,7	0,3	1,0
Corps neutres	-	0,1	-	0,2	0,2	0,1
Acides aminés des protéines	10,5	18,6	13,7	24,2	17,2	21,5

que (figure 16). Leur radioactivité est toutefois très faible et, de ce fait, difficilement mesurable, de même que celle du glucose, seul composé marqué dans la fraction neutre.

Par contre, la majeure partie du ^{14}C se localise dans les composés azotés protéiques et surtout solubles, cette dernière fraction renfermant en outre le traceur restant, non métabolisé. Les principales substances élaborées à partir de l'arginine U-^{14}C figurent dans le tableau XXXVI.

La radioactivité de l'ornithine et de l'urée représente en moyenne, au bout de 2 heures de métabolisme, 81 % de la radioactivité totale des composés azotés solubles. Ceci indique clairement que l'hydrolyse de l'arginine constitue la principale voie d'utilisation in vivo de cet aminoacide. L'arginase, responsable de cette dégradation, a été mise en évidence dans les carpophores d'Agaricus bisporus par YAMAMOTO, ERITATE et MIWA (1953) et par REINBOTHE, WASTERNACK et MIERSCH (1967).

Ces auteurs ont également caractérisé, dans le champignon de couche, l'uréase : une forte proportion de gaz carbonique radioactif provient sans doute de la destruction de l'urée, dont le marquage diminue dans les essais de plus lon-

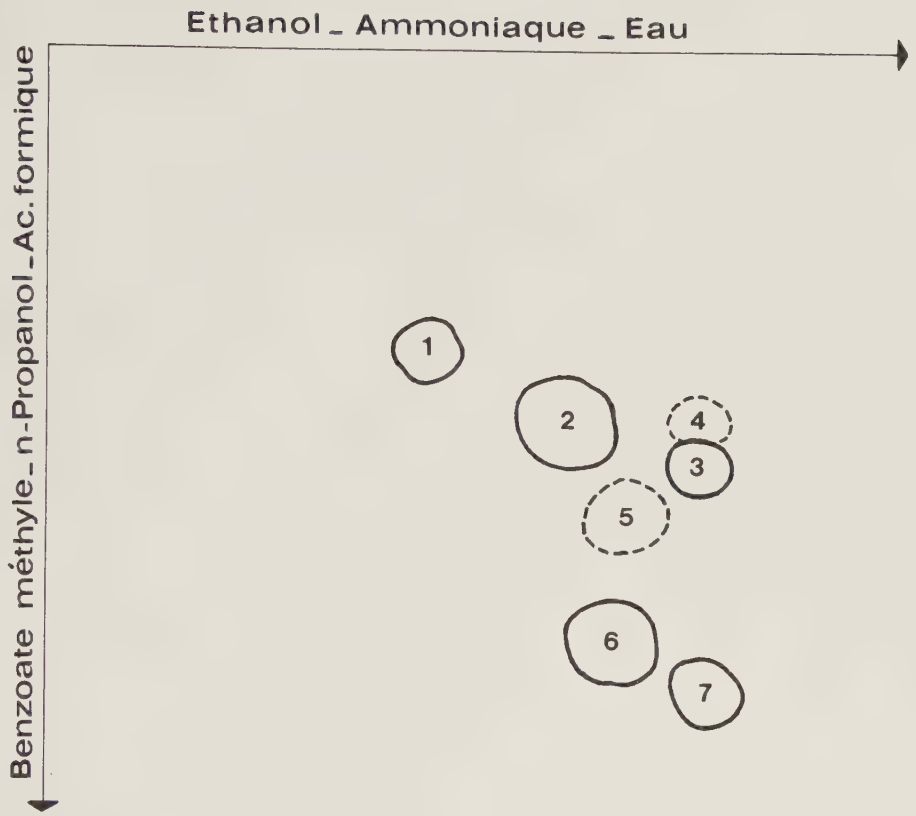


Figure 16 - Acides organiques marqués à partir d'arginine $U^{14}C$ (carpophores de 3eme volée, durée de métabolisme : 6 heures).

1 : ac. citrique ; 2 : ac. malique ; 3 : ac. pyrrolidone-carboxylique ; 4 : ac. glycolique ; 5 : ac . α-cétoglutarique ; 6 : ac. succinique ; 7 : ac. fumarique.

TABLEAU XXXVI

Composés marqués formés à partir d'arginine U-^{14}C.
(Radioactivité exprimée en milliers d'impulsions/minute/gramme de matériel sec).

	1ère volée		3ème volée		5ème volée	
	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures
I- Composés azotés libres.						
Urée	403	437	501	408	450	390
Ornithine	1481	1522	1786	1810	1589	1533
Citrulline	-	30	66	70	29	37
Acide arginino-succinique	65	25	53	22	48	29
Acide glutamique	106	233	208	504	189	430
Acide γ-aminobutyrique	-	8	7	13	28	50
Proline	34	39	34	60	39	78
Glutamine	55	21	56	27	49	25
Acide aspartique	11	36	21	98	19	80
Asparagine	-	-	-	-	8	14
α-Alanine	-	-	7	11	12	17
Agmatine	78	141	55	140	68	152
Composé non identifié X	12	20	14	10	13	-
Acide γ-guanidino-butyrique	42	46	25	15	18	+
II- Acides aminés des protéines						
Arginine	462	620	625	988	539	801
Acide glutamique	-	25	10	50	8	41

gue durée. L'ornithine donne vraisemblablement naissance à la citrulline et à l'acide argininosuccinique par l'intermédiaire du cycle de KREBS et HENSELEIT (1932). Il est logique de supposer qu'elle est aussi à l'origine de la proline et de l'acide glutamique marqués (MEISTER, 1965). Glutamine et acide γ-aminobutyrique (LATCHÉ, 1963 a) dérivent directement de l'acide glutamique qui, par perte de son radical $-NH_2$, aboutit également à la formation d'acide α-cétoglutarique. A partir de ce dernier composé, l'intervention des enzymes du cycle tricarboxylique et des transaminases explique le marquage d'une part des acides organiques, d'autre part celui de l'acide aspartique. L'alanine résulte enfin de l'amination de l'acide pyruvique, vraisemblablement issu de la décarboxylation de l'acide oxalacétique.

Le catabolisme de l'arginine conduit en outre à la synthèse d'agmatine, d'acide γ-guanidobutyrique et d'un composé X qu'il m'a été impossible d'identifier au terme de cette série d'expériences. La présence d'agmatine dans le mycélium d'Agaricus bisporus a été rapportée par PIQUEMAL (1970) ; par contre, toutes les tentatives effectuées pour la caractériser à l'état libre dans les carpophores se sont soldées par des résultats négatifs. Sa formation par décarboxylation enzymatique de l'arginine a été signalée chez quelques Invertébrés marins (BARET, MOURGUE et BROC, 1965) et chez divers microorganismes (BARET, MOURGUE et BROC, 1966). L'arginine décarboxylase a été purifiée par SHER et MALETTE (1954) à partir d'extraits cellulaires d'Escherichia coli.

L'acide γ-guanidobutyrique a été mis en évidence dans les premiers stades de développement des fructifications d'Agaricus bisporus ; il n'existe toujours qu'en petites quantités et disparaît dans les organismes adultes et âgés. Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de sa synthèse :

- réaction de transamidination entre l'arginine et l'acide γ-aminobutyrique,
- décarboxylation oxydative de l'acide α-céto-δ-guanidovalérianique résultant de la perte, soit par désamination oxydative, soit après transamination, du $-NH_2$ en position α de l'arginine,
- hydrolyse de la γ-guanidobutyramide issue d'une décarboxylation oxydative de l'arginine, selon le schéma :

$$HN = \underset{\underset{NH_2}{|}}{C} - NH-(CH_2)_3 - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH + O_2 \xrightarrow{\text{arginine décarboxyoxydase}}$$

arginine

$$HN = \underset{\underset{NH_2}{|}}{C} - NH - (CH_2)_3 - CO - NH_2 + CO_2 + H_2O$$

γ-guanidobutyramide

$$\gamma\text{-guanidobutyramide} + H_2O \xrightarrow[\text{butyramidase}]{\gamma\text{-guanido-}} HN = \underset{\underset{NH_2}{|}}{C} - NH - (CH_2)_3 - COOH + NH_3$$

Cette dernière voie métabolique est toutefois peu répandue ; l'existence de l'arginine décarboxylase est mentionnée dans les tissus de Limnée (THOAI, ROBIN, PRADEL, 1957) et les travaux les plus importants ont été effectués à partir de Streptomyces griseus (THOAI, HATT et TRAN TI AN, 1956 ; THOAI et OLOMUCKI, 1962). Ce microorganisme a également servi de matériel d'étude de la γ-guanidobutyramidase (THOAI, THOMÉ-BAU et DANG BA PHO, 1962).

II - IDENTIFICATION DU COMPOSE X : CATABOLISME DE IA L-ARGININE GUANIDO ^{14}C.

La réaction du composé X au réactif de Sakaguchi, quoique faiblement positive, incitait à penser qu'il conservait dans sa molécule le groupement guanidique de l'arginine. Dans le but de vérifier cette hypothèse, de la L-arginine guanido-^{14}C a été administrée à des carpophores. Le mode opératoire suivi est identique à celui qui a été adopté dans les essais se rapportant au catabolisme de l'arginine U-^{14}C. Toutefois, le liquide d'extraction n'a pas été passé sur échangeurs d'ions, la récupération de certains composés guanidiques étant parfois incomplète à l'issue de ces traitements.

L'autoradiographie (figure 17) révèle la présence de quatre taches radioactives correspondant à l'urée, l'acide γ-guanidobutyrique, l'agmatine et le composé X dont la nature guanidique est ainsi confirmée.

Une analyse par chromatographie monodimensionnelle, sur papier Whatman n° 1, a été réalisée à l'aide des solvants utilisés par THOAI, HATT et TRAN TI AN (1956) pour l'étude de l'arginine décarboxyoxydase de Streptomyces griseus. La composition, en millilitres, de ces mélanges solvants est la suivante :

1 - Pyridine : 80 ; Isoamylol : 40 ; Eau : 40 ; Acide acétique : 10.
2 - Pyridine : 80 ; Isoamylol : 40 ; Eau : 70.
3 - Pyridine : 80 ; Isoamylol : 40 ; Eau : 40 ; Ammoniaque : 10.
4 - Butanol : 73 ; Eau : 17 ; Acide acétique : 10.
5 - Propanol : 40 ; Eau : 10 ; Acide acétique : 10.
6 - Propanol : 73 ; Eau : 7 ; Ammoniaque : 20.

Dans la plupart des cas, la migration du composé X diffère de celle de la γ-guanidobutyramide, déduite des résultats de THOAI et coll. Par contre, comme

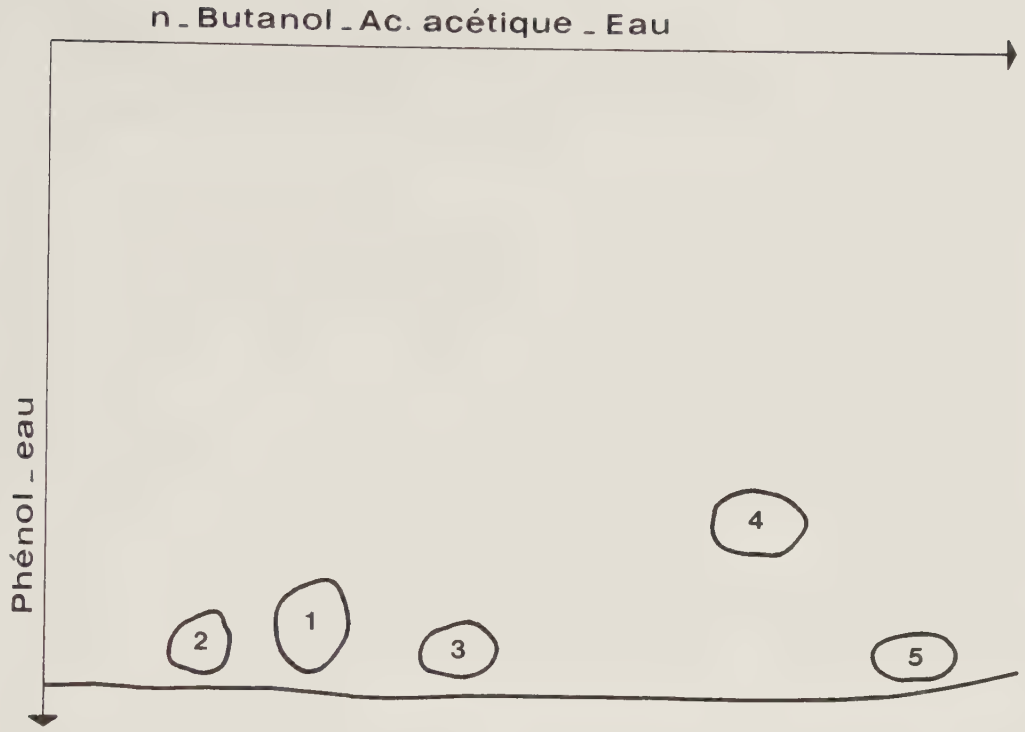


Figure 17 - Catabolisme de l'arginine guanido-^{14}C : composés marqués.

1 : arginine ; 2 : agmatine ; 3 : composé X (acide α-céto-δ-guanidovalérianique) ; 4 : urée ; 5 : acide δ-guanido-butyrique.

le montre le tableau XXXVII, il y a identité de position entre la substance inconnue et l'acide α-céto-δ-guanidovalérianique, préparée par action sur l'arginine de L-aminoacide oxydase du commerce*.

---

* La L-amino acid oxidase (Snake Venom) provient de la Nutritional Biochemicals Corporation.

TABLEAU XXXVII

Migration du composé X et de l'acide α-céto-δ-guanidovalérianique dans les différents solvants précités, exprimée par les rapports

$$\frac{\text{distance parcourue par le corps considéré}}{\text{distance parcourue par l'acide } \gamma\text{-guanidobutyrique}}$$

	Solvant 1	Solvant 2	Solvant 3	Solvant 4	Solvant 5	Solvant 6
Composé X	0,65	1,05	0,96	0,33	0,68	0,92
Acide α-céto-δ-guanidovalérianique	0,62	1,06	0,95	0,31	0,67	0,92

Ceci permet d'identifier le composé X comme étant l'acide α-céto-δ-guanidovalérianique. Son mode de formation à partir de l'arginine sera envisagé dans la suite de ce travail.

III - DISCUSSION.

L'étude du devenir de l'arginine U-^{14}C et guanido -^{14}C a permis de dégager, dans les carpophores d'Agaricus bisporus, quatre voies d'utilisation de l'arginine, d'importance d'ailleurs très inégale :

1 - décarboxylation en agmatine,

2 - transformation en acide α-céto-δ-guanidovalérianique, qui peut donner naissance à l'acide γ-guanidobutyrique,

3 - incorporation dans les protéines,

4 - hydrolyse sous l'action de l'arginase conduisant à l'urée* et à l'ornithine. Alors que l'urée est partiellement dégradée en CO_2 et NH_3, le squelette carboné de l'ornithine est à l'origine de la citrulline et de l'acide argininosuccinique, des acides glutamique et γ-aminobutyrique*, de la proline, de la glutamine, des acides organiques du cycle de KREBS, de l'α-alanine, de l'acide aspartique et de l'asparagine. Ces substances apparaissent essentiellement au terme des expériences de plus longue durée.

* REINBOTHE (1964) a montré que le champignon de couche était susceptible d'hydrolyser l'acide γ-guanidobutyrique en urée et acide γ-aminobutyrique. Il n'a pas été tenu compte dans ce bilan (tableau XXXVIII) de cette possibilité, les quantités d'acide γ-guanidobutyrique formé à partir de l'arginine étant toujours très faibles.

Dans le tableau XXXVIII sont comparés les résultats se rapportant au catabolisme de l'arginine uniformément marquée, dans les champignons de première, troisième et cinquième volées. Les données numériques concernant les carpophores de première volée (temps de métabolisme : 2 heures) sont affectées de l'indice 100, et celles correspondant aux autres essais sont calculées par rapport à cet indice.

TABLEAU XXXVIII

Catabolisme de l'arginine U-^{14}C par les carpophores de première, troisième et cinquième volées.

Substances radioactives	1ère volée		3ème volée		5ème volée	
	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures
Urée	100	108	124	101	112	97
Ornithine	100	103	121	122	107	104
Composés dérivant directement ou indirectement de l'ornithine	100	150	164	294	153	283
Gaz carbonique	100	632	149	1296	160	851
Agmatine	100	181	71	180	87	195
Acides α-céto-δ-guanidovalérianique et γ-guanidobutyrique	100	122	72	46	57	-
Arginine des protéines	100	134	135	214	117	173

L'examen du tableau précédent fait apparaître des différences sensibles dans le métabolisme des champignons issus des poussées successives d'une même culture. On note essentiellement dans les carpophores de troisième et, à un degré moindre, de cinquième volées, une synthèse plus importante d'urée, d'ornithine et surtout des corps élaborés à partir de ce dernier composé (acide glutamique en particulier). Ceci suppose un accroissement préalable de l'activité arginasique :

le bien-fondé de cette hypothèse sera examiné. On observe également dans ces mêmes échantillons un dégagement accru de gaz carbonique radioactif que l'on peut vraisemblablement relier à une activité uréasique supérieure : en effet, l'agmatine, provenant de la décarboxylation de l'arginine, se maintient dans tous les essais à un taux constant. Par contre, les acides α-céto-δ-guanidovalérianique et γ-guanidobutyrique se forment en quantité supérieure dans les carpophores récoltés en début de culture.

On remarque enfin que l'incorporation d'arginine dans les protéines s'effectue de façon plus intense en cinquième et surtout en troisième volées. Ces résultats sont en accord avec les bilans azotés faisant l'objet de la première partie de ce travail.

C - DEGRADATION DE L'ARGININE EN ORNITHINE ET UREE : ETUDE DE L'ARGINASE.

I - CONDITIONS OPTIMALES D'ACTION.

1 - Protocole d'étude.

Le matériel végétal est constitué par une poudre acétonique préparée (REINBOTHE, 1964) à partir des carpophores de troisième volée.

Le protocole expérimental dérive de celui exposé par BALDY (1962 a) et GUITTON (1964). La mesure de l'activité enzymatique repose sur le dosage, selon la méthode de FOSSE (1928), de l'urée engendrée par hydrolyse de l'arginine. L'adoption de cette technique a été rendue possible par le fait que l'uréase, mise en évidence dans le champignon de couche par REINBOTHE et coll. (1967), est totalement inactive dans les conditions d'étude de l'arginase. La composition des différents milieux réactionnels figure dans le tableau XXXIX.

Le poids du matériel végétal a été fixé à 100 mg, la durée des expériences, réalisées en milieu agité, étant de 15 minutes ; il a été vérifié qu'il y avait dans ce cas proportionnalité directe entre le taux de substrat dégradé et, d'une part la concentration en catalyseur, d'autre part le temps d'action de l'enzyme*.

---

* Ceci n'est plus vrai pour des prises d'essais supérieures à 150 mg de matériel végétal ainsi que pour des durées d'hydrolyse excédant 20 minutes. HUNTER et DOWNS (1945) ont également constaté, avec l'arginase d'origine animale, que la quantité d'urée formée n'était pas proportionnelle à la teneur en matériel enzymatique ; ce fait est attribué à un effet inhibiteur de l'ornithine engendrée au cours de l'hydrolyse. Ce rôle inhibiteur de l'ornithine sur l'arginase a été confirmé par GUITTON, en 1964.

TABLEAU XXXIX

Composition des essais et témoins pour l'étude de l'arginase

	E_1	E_2	T_1	T_2	T_3
Matériel végétal (mg)	100	-	100	-	-
Matériel végétal porté 30 minutes à 100° C (mg)	-	100	-	100	-
Solution d'arginine en milieu tamponné (ml)	5	5	-	-	5
Tampon phosphate monopotassique 0,2 M - Soude 0,2 N de CLARK et LUBS (BRUNEL, 1948) (ml)	-	-	5	5	-
Eau distillée (ml)	5	5	5	5	5
Toluène redistillé (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

La différence entre les quantités d'urée dosées dans E_1 et T_1 permet d'évaluer l'importance de l'hydrolyse de l'arginine. Celle-ci n'est pas spontanée, comme l'indique le témoin T_3 qui conduit toujours à des résultats négatifs, mais de nature enzymatique puisque le végétal dont les protéines ont été dénaturées par la chaleur (E_2, T_2), ne peut la provoquer. Parallèlement à la formation d'urée, l'apparition d'ornithine a été contrôlée dans l'essai E_1 par chromatographie sur papier.

2 - Résultats.

Les résultats obtenus sont portés sur la figure 18. Ils sont exprimés en micromoles d'urée formées en une minute pour un poids de végétal correspondant à une millimole d'azote protéique.

a - Influence du pH.

L'arginase manifeste son activité dans une zone de pH relativement restreinte (figure 18 a). Cette même constatation avait été effectuée par BAIDY (1962 a, 1962 b), à propos de l'enzyme d'Aspidium aculeatum et par GUITTON (1964) dans les plantules de Pinus pinea. Chez les végétaux, l'optimum d'action se situe respectivement à pH 10,3 et à pH 9,5. Cette dernière valeur a également été retenue pour l'étude du catalyseur d'Arum italicum (BRUNEL-CAPELLE et BRUNEL, 1965 ; BRUNEL-CAPELLE et DE SERRES, 1967) et d'un champignon inférieur, Penicillium roque-

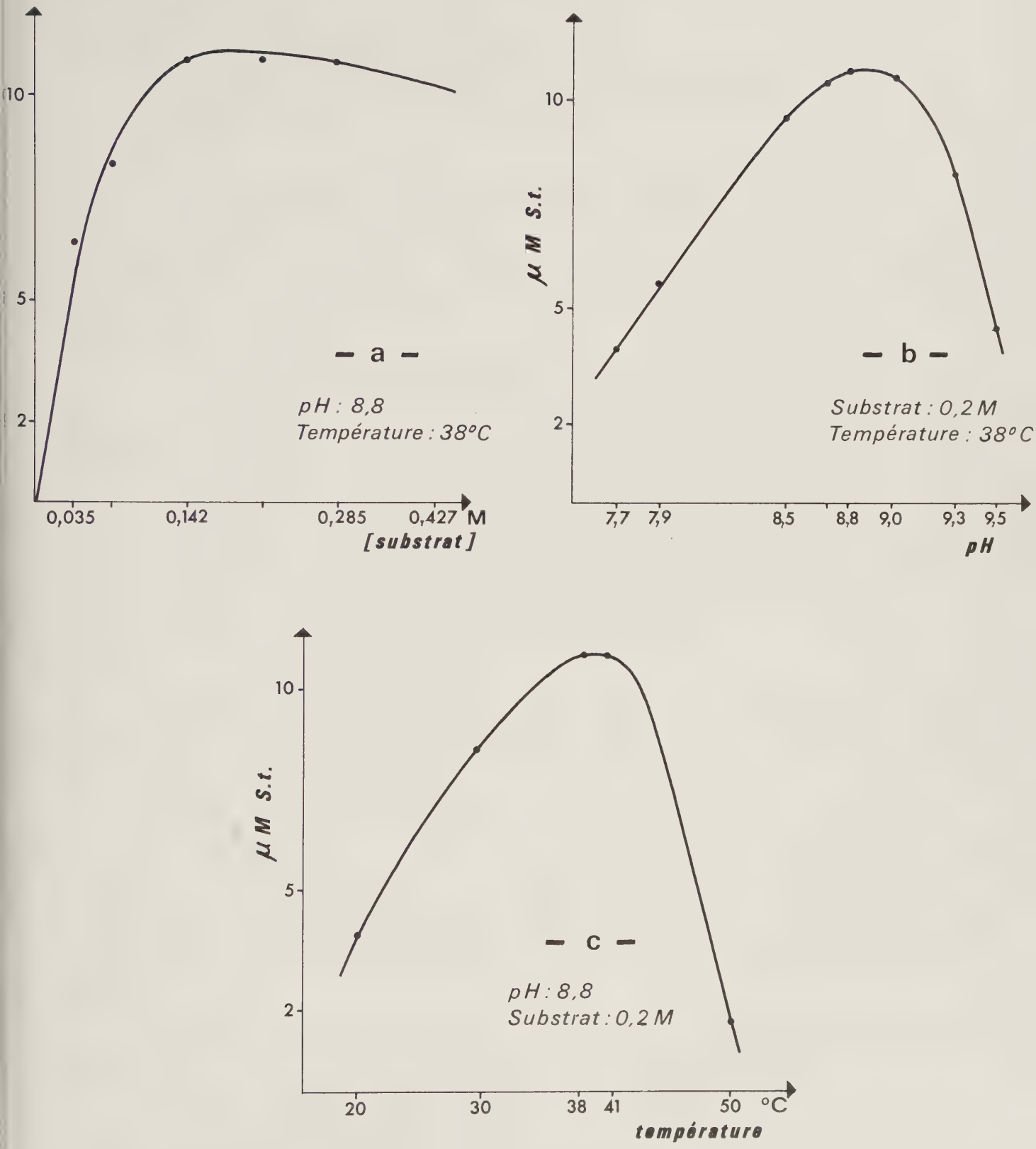


Figure 18 - Conditions optimales d'action de l'arginase (substrat transformé en micromole/1 millimole de N protéique/ minute).

forti (BRUNEL, BRUNEL-CAPELLE et MIQUEL, 1967).

Par contre, dans les carpophores d'Agaricus bisporus, la dégradation d'arginine la plus élevée est observée pour des valeurs faiblement inférieures du pH (pH 8,8).

b - Influence de la concentration en substrat.

L'intensité d'hydrolyse de l'arginine augmente en fonction de la teneur en substrat puis tend à devenir constante à partir d'une concentration égale à 0,142 M (figure 18 b). J'ai retenu la concentration 0,2 M pour les déterminations ultérieures de l'activité arginasique.

c - Influence de la température.

Dans les conditions expérimentales retenues, l'activité de l'enzyme est maximale dans une zone comprise entre 38 ° et 40° C. On note à 50° une diminution très nette de la quantité d'urée engendrée.

Les caractéristiques de l'arginase d'Aspidium aculeatum (BAIDY, 1962 a, 1962 b) et de Pinus pinea (GUITTON, 1964) sont très légèrement différentes : l'optimum en fonction de la température est situé entre 43 et 48° C, l'inactivation thermique du catalyseur se produisant au-dessus de 60° C.

II - INFLUENCE DES IONS Mn^{++} SUR L'ACTIVITE ARGINASIQUE.

STOCK, PERKINS et HELLERMAN (1938) ont étudié l'activation, par les ions métalliques, de l'arginase de Canavalia ensiformis. Ce problème a été approfondi en 1945 par ANDERSON sur l'enzyme isolée de ce même matériel : les ions Mn^{++} et Co^{++} augmentent l'hydrolyse enzymatique de l'arginine.

Selon MOHAMED et GREENBERG (1945), l'activation de l'arginase par les ions Mn^{++} s'expliquerait par la transformation d'une pro-arginase inactive en catalyseur actif. Cette hypothèse est fondée sur les constatations suivantes :

- La préparation enzymatique purifiée, obtenue à partir de foie de mammifères et catalysant l'hydrolyse de l'arginine, renferme, à l'état de traces, des ions Mn^{++} et Co^{++}.
- L'élimination de ces cations par dialyse diminue considérablement le pouvoir catalytique qui est, par contre, restauré par un nouvel apport d'ions Mn^{++}.

Plus récemment, BRUNEL-CAPELLE et BAILLY-FENECH (1967) ont montré que l'addition de manganèse rendait possible la mise en évidence, in vitro, d'une activité arginasique dans des échantillons qui conduisaient sans cela à des résultats négatifs.

En ce qui concerne Agaricus bisporus, l'introduction dans le milieu réactionnel d'ions Mn^{++}, apportés sous forme de sulfate (concentration : 0,02 M), augmente nettement l'activité de l'arginase. La quantité d'arginine hydrolysée est en moyenne 10 fois plus élevée. Cette observation m'a incité à déterminer l'activité arginasique en présence de manganèse.

III - ACTIVITE ARGINASIQUE EN FONCTION DU PHENOMENE DES VOLEES.

Les résultats acquis sont groupés dans le tableau XL. Les conditions expérimentales retenues sont celles qui ont été reconnues optimales, soient :

- pH : 8,8
- concentration en arginine : 0,2 M
- concentration en SO_4Mn, H_2O : 0,02 M
- matériel végétal : 100 mg
- température : 38° C ; durée d'incubation : 15 minutes.

TABLEAU XL

Activité arginasique en fonction du phénomène des volées.
(Résultats en micromoles d'arginine dégradées par minute et pour un poids de végétal correspondant à 1 millimole d'azote protéique)

	1ère volée	3ème volée	5ème volée
Activité arginasique	81,0	108,8	82,8

Quel que soit l'échantillon considéré, l'arginase présente une activité élevée. Son importance physiologique a été mise en lumière par les travaux, déjà cités, de REINBOTHE et TSCHIERSCH (1962) et WATERNACK et REINBOTHE (1966 et 1967). Selon ces auteurs, l'hydrolyse de l'arginine constitue la dernière étape de la biosynthèse de l'urée dans les carpophores de Lycoperdon perlatum et d'Agaricus bisporus.

L'activité arginasique est maximale dans les champignons de troisième volée. Ce résultat est conforme aux données obtenues à l'issue de l'étude du métabolisme in vivo de l'arginine marquée au ^{14}C. Si l'on considère que la transformation en ornithine et urée est, avec l'incorporation dans les protéines, le prin-

cipal devenir de l'arginine, l'accroissement des teneurs en cet aminoacide dans les carpophores de troisième volée ne peut donc pas s'expliquer par un défaut d'utilisation.

D - DESAMINATION OXYDATIVE DE L'ARGININE : MISE EN EVIDENCE DE L'ENZYME.

L'existence dans le champignon de couche d'un possible transfert enzymatique de $-NH_2$ entre l'arginine et l'acide α-cétoglutarique a été établie antérieurement (voir pages 80-81). La formation d'acide α-céto-δ-guanidovalérianique pourrait être par conséquent redevable de ce processus, bien que l'activité de la transaminase arginine-acide α-cétoglutarique soit toujours assez faible : dans les conditions les plus favorables (carpophores de première et troisième volées), on aboutit à la synthèse de 0,4 micromole d'acide glutamique par minute pour un poids de matériel végétal correspondant à 1 millimole d'azote protéique.

La découverte par REINBOTHE (1964) d'une L-arginine oxydase dans les fructifications de deux Basidiomycètes, Lycoperdon perlatum et Lycoperdon pyriforme m'a cependant incité à rechercher chez Agaricus bisporus la présence d'une même enzyme. Son mécanisme d'action peut se schématiser ainsi :

(a) $HN = C(NH_2) - NH - (CH_2)_3 - CH(NH_2) - COOH + Enzyme \longrightarrow$

Arginine

$HN = C(NH_2) - NH - (CH_2)_3 - C(=NH) - COOH + Enzyme - H_2$

(b) $Enzyme - H_2 + O_2 \longrightarrow H_2O_2 + Enzyme$

(c) $HN = C(NH_2) - NH - (CH_2)_3 - C(=NH) - COOH + H_2O \longrightarrow HN = C(NH_2) - NH - (CH_2)_3 - C(=O) - COOH + NH_3$

acide α-céto-δ-guanidovalérianique

En présence de catalase dans le milieu réactionnel, le cétoacide apparu est dégradé par oxydation secondaire en acide γ- guanidobutyrique, lui-même hydrolysé ensuite dans le champignon de couche (REINBOTHE, 1964) en acide γ-aminobutyrique et urée :

(d) acide α-céto-δ-guanidovalérianique + 1/2 O_2 ⟶

$$HN = C(NH_2) - NH - (CH_2)_3 - COOH + CO_2$$

acide γ-guanidobutyrique

(e) acide γ-guanidobutyrique + H_2O ⟶ $O = C(NH_2)_2$ + $H_2N - (CH_2)_3 - COOH$

Urée acide γ-aminobutyrique

I - MODE OPERATOIRE.

L'oxydation enzymatique de l'arginine a été suivie par mesure, à l'appareil de Warburg, de l'oxygène absorbé et du gaz carbonique dégagé. Parallèlement, la composition du milieu réactionnel a été analysée par chromatographie sur papier et autoradiographie.

1 - Matériel végétal.

L'utilisation de poudre brute (matériel séché sous vide) ou de poudre acétonique a toujours conduit à des résultats négatifs. Aussi ai-je été amené à adopter le protocole expérimental suivant, préconisé par WALKER (1958) et REINBOTHE (1964).

60 g de carpophores frais, récoltés en première volée, sont broyés à basse température (0° C, omnimixer Sorvall, 8 minutes) dans 250 ml de tampon phosphate monopotassique-phosphate bipotassique M/15, pH 7,5 contenant 1,5 g d'acide éthylènediaminetétracétique (sel de sodium, Sigma) et 32,2 mg de glutathion réduit (Sigma). Le broyat est agité pendant 15 minutes, puis centrifugé (0° C, 15 minutes, 14.000 g). On ajoute par petites quantités au surnageant une solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium (''Enzyme grade'', Nutritional Biochemicals Corporation), jusqu'à atteindre 60 % de la saturation en $SO_4(NH_4)_2$. Après 15 minutes d'agitation, le précipité est recueilli par centrifugation(- 2° C, 15 minutes, 14.000 g) et repris par 18 ml de tampon phosphate de potassium M/15, pH 7,5, renfermant 100 mg d'EDTA. On procède sur cette préparation à une seconde précipitation des protéines par addition goutte à goutte, de 30,6 ml d'une solution de sulfate d'ammonium 3,9 M. Le culot protéique est récupéré par centrifugation (condi-

tions identiques à la précédente) et dissous dans 5 à 8 ml de tampon phosphate M/15. Il est enfin dialysé durant 18 heures, à 4° C, contre 10 litres de tampon phosphates monopotassique-bipotassique M/150, pH 7,5, selon le procédé de ''dialyse à volume constant'' décrit par LOISELEUR (1954). Le matériel enzymatique (volume final : 13 ml) est utilisé sitôt son obtention.

2 - Composition des essais et témoins.

Les essais et témoins, réalisés dans des fioles de Warburg à deux diverticules latéraux et à cellule centrale, ont la composition indiquée dans le tableau XLI. Ils sont préparés en double exemplaire : dans le second lot, le gaz carbonique susceptible de se dégager (réaction (d), page 123) est absorbé par une solution de potasse à 15 %, introduite dans la cellule centrale des fioles de Warburg. Les expériences se déroulent toujours en atmosphère d'oxygène.

TABLEAU XLI

Recherche de la L-arginine oxydase d'Agaricus bisporus.

	Essai E	Témoin T	Témoin T'
Corps de la fiole.			
- Préparation enzymatique	1 ml	-	1 ml
- Tampon phosphate monopotassique-phosphate disodique M/5, pH 7,5	1 ml	1 ml	1 ml
- Tampon phosphate monopotassique-phosphate disodique M/15, pH 7,5	-	1 ml	-
Diverticule 1.			
- Solution aqueuse de L-arginine, à 50 µMoles/ml, pH 7,5	0,2 ml	0,2 ml	-
- Solution aqueuse de L-arginine, guanido-^{14}C, à 5 µMoles/ml. Radioactivité : 33 µcuries/ml	50 µl	50 µl	-
- Eau distillée	-	-	0,25 ml
Diverticule 2.			
- Acide sulfurique 1,2 N	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml

Le témoin T a pour but de rendre compte d'une éventuelle décomposition du substrat en l'absence de catalyseur : le résultat a toujours été négatif. La différence entre les échanges gazeux observés à partir de E et T' rend possible la détermination de la quantité de substrat transformé. En fin d'expérience, l'addition d'acide sulfurique (diverticule 2) permet d'arrêter instantanément la réaction ; de plus, elle provoque la libération du CO_2 retenu dans le milieu tamponné à pH 7,5.

Lors de l'étude du phénomène au Warburg, la durée d'incubation à 34° C a été fixée à 60 minutes ; elle a été par la suite prolongée en vue des analyses chromatographiques et autoradiographiques des composés formés.

II - RESULTATS.

En une heure, l'absorbtion d'oxygène, rapportée à la quantité de matériel végétal correspondant à une millimole d'azote protéique, équivaut à l'oxydation de 4,2 micromoles d'arginine. Le dégagement de CO_2, observé durant la même période, est égal à la moitié du volume d'oxygène absorbé.

Ces échanges gazeux coïncident avec l'apparition dans le milieu réactionnel d'acide α-céto-δ-guanidovalérianique, d'acide γ-guanidobutyrique et d'urée. Le tableau XLII indique, en %, la répartition de la radioactivité dans ces différents composés en fonction du temps d'action de l'enzyme.

TABLEAU XLII

Composés formés (en %) au cours de l'oxydation de l'arginine.

	Durée d'incubation à 34° C		
	1 heure	4 heures	8 heures
Acide α-céto-δ-guanidovalérianique	40,0	38,0	20,1
Acide γ-guanidobutyrique	38,5	42,8	60,9
Urée	21,5	19,2	19,0

Ces résultats conduisent aux conclusions suivantes :

- L'existence, dans les carpophores d'Agaricus bisporus, d'une L-arginine oxydase

semble indiscutable. Toutefois, l'activité de cette enzyme, dans nos conditions d'expériences*, est très réduite et la part prise par ce processus dans l'utilisation de l'arginine paraît de peu d'importance.

- L'oxydation ultérieure de l'acide α-céto-δ-guanidovalérianique donne naissance à de l'acide γ-guanidobutyrique. Cette voie métabolique, déjà signalée dans les fructifications de Lycoperdon (REINBOTHE, 1964) a également été mentionnée dans les tissus d'invertébrés marins (ROCHE, THOAI et GIAHN, 1952), d'insectes (GARCIA, TIXIER et ROCHE, 1956 ; GARCIA, COUERBE et ROCHE, 1957) et chez certaines bactéries (NAKADA, 1954). Cette réaction peut entièrement justifier la présence des faibles quantités d'acide γ-guanidobutyrique détectées dans le champignon de couche au premier stade de son développement. Cependant, l'éventualité d'un mode de formation par transamidination entre l'arginine et l'acide γ-aminobutyrique ne doit pas être entièrement rejetée. En effet, l'incubation de coupes de tissus frais dans une solution d'arginine aboutit à la mise en évidence de faibles quantités d'acide γ-guanidobutyrique et à la disparition concomitante d'acide γ-aminobutyrique. La recherche de la transamidinase, selon la technique de WALKER (1958), s'est soldée toutefois par des résultats négatifs.

- Selon REINBOTHE (1964), l'hydrolyse de l'acide γ-guanidobutyrique en urée et acide γ-aminobutyrique constitue une des origines possibles de la carbamide chez Agaricus et Lycoperdon. L'apparition d'urée marquée pourrait par conséquent s'expliquer par ce mécanisme. Toutefois, il m'a toujours été impossible de déceler la présence d'acide γ-aminobutyrique dans le milieu réactionnel. De plus, la production d'urée est maximale à pH 8,8, soit pour la valeur du pH correspondant à l'optimum d'action de l'arginase. Il n'est donc pas interdit de penser que la préparation enzymatique utilisée pour l'étude de la L-arginine oxydase possède en même temps une faible activité arginasique.

---

* Ces conditions expérimentales ont été adoptées après quelques essais préliminaires qui m'ont permis de préciser en particulier la valeur optimale du pH, égale à 7,5 et pratiquement identique à celle (7,3) retenue pour l'étude de l'enzyme dans les carpophores de Lycoperdon par REINBOTHE (1964). Cet auteur mentionne également que l'addition au milieu réactionnel de FAD, coenzyme des L-aminoacides oxydases, n'entraîne aucune modification de l'activité catalytique : il en est de même dans le cas d'Agaricus bisporus.

E - CATABOLISME DE LA PROLINE U-^{14}C.

L'étude du catabolisme de la proline par les carpophores de première, troisième et cinquième volées aboutit aux données groupées dans les tableaux XLIII, XLIV et XLV.

Le tableau XLIII est consacré à la répartition du ^{14}C, au bout de 2 et 6 heures de métabolisme. Les résultats, rapportés à un gramme de végétal sec, sont exprimés en % de la radioactivité totale des composés formés. Ils sont obtenus par comptage de chaque fraction au compteur Geiger ; on retranche toutefois de la valeur trouvée pour les composés azotés solubles la part qui revient au précurseur non métabolisé, dont la proportion relative (40 à 65 %) est déduite, après autoradiographie, des mesures effectuées au compteur à scintillation.

TABLEAU XLIII

Catabolisme de la proline U^{14}C : répartition (en %) de la radioactivité dans les différents composés formés.

	1ère volée		3ème volée		5ème volée	
	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures
Gaz carbonique	1,1	6,7	1,3	3,1	2,2	3,5
Composés azotés solubles	66,8	60,7	59,2	61,5	67,7	66,3
Acides aminés des protéines	28,5	27,0	34,6	30,9	26,6	24,7
Acides organiques	3,6	5,5	4,9	4,4	3,5	5,3
Corps neutres	0	0,1	0	0,1	0	0,2

On constate que la quantité de proline retrouvée dans les macromolécules insolubles équivaut à environ 30 % de la quantité totale d'aminoacide utilisé. En fonction du temps de métabolisme, cette proportion s'accroît jusqu'à atteindre, au bout de 12 heures, 45 % dans les carpophores de troisième volée et 39 % pour les échantillons récoltés en début et en fin de culture. L'incorporation dans les protéines représente quantitativement pour les fructifications d'Agaricus bisporus

une importante voie d'intervention de la proline dans le métabolisme azoté.

L'analyse de la fraction azotée soluble (Tableau XLIV) permet de caractériser une intense formation d'acide glutamique.

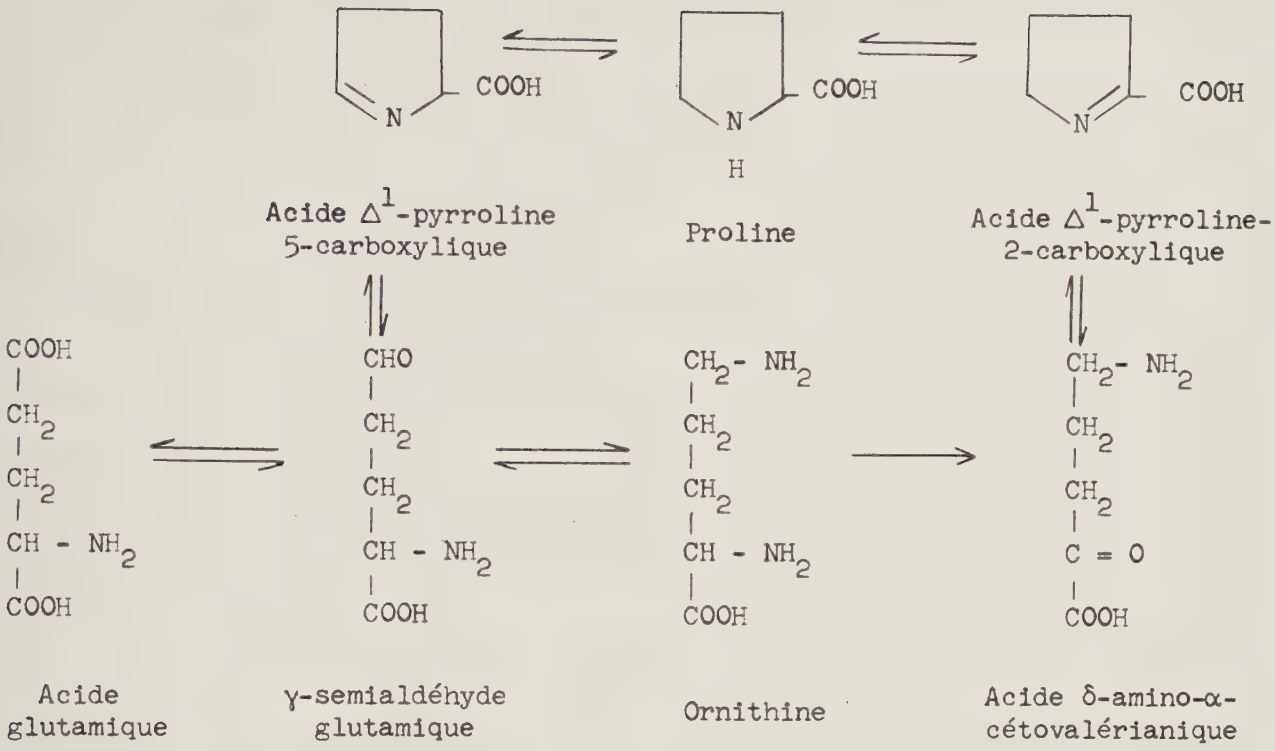
TABLEAU XLIV

Principaux composés marqués dans la fraction azotée soluble (Radioactivité en milliers d'impulsions/minute/gramme de végétal sec).

	1ère volée		3ème volée		5ème volée	
	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures
Acide glutamique	517	896	645	1705	656	1458
" γ-aminobutyrique	23	15	37	57	27	57
Glutamine	12	14	14	20	13	16
Ornithine	+	13	11	49	9	41
Citrulline	-	+	8	23	+	13
Arginine	-	-	-	15	-	11
Acide aspartique	41	139	49	272	49	417
α-Alanine	-	16	7	35	15	36
Urée	-	-	6	20	+	13

L'étude du mécanisme de passage de la proline à l'acide glutamique n'a pas été abordée au cours de ce travail. Les résultats de DURANTON (1959), joints à d'autres données acquises essentiellement à partir de tissus animaux et de microorganismes, permettent d'élaborer le schéma ci-après (FOWDEN, 1965).

L'amination de la γ-semialdéhyde glutamique peut donner naissance à l'ornithine, elle-même à l'origine de la citrulline et, dans les champignons de troisième et cinquième volées, de l'arginine. La majeure partie du gaz carbonique radioactif se forme vraisemblablement par décarboxylation de l'acide glutamique en acide γ-aminobutyrique. Enfin, la radioactivité détectée dans la glutamine, l'acide aspartique, l'α-alanine et les acides organiques (acides succinique, fumarique, malique, citrique et pyrrolidone carboxylique) doit également trouver



sa source dans le squelette carboné de l'acide glutamique : le métabolisme de ce dernier composé fera l'objet du paragraphe suivant.

L'examen du catabolisme de la proline en fonction du phénomène des volées conduit à des conclusions identiques à celles qui avaient été avancées à l'issue des expériences consacrées au devenir in vivo de l'arginine marquée. Synthèse d'acide glutamique et incorporation dans les protéines (Tableau XLV) sont optimales dans les champignons récoltés en troisième volée.

TABLEAU XLV

Acides aminés des protéines (Radioactivité en milliers d'impulsions/minute/gramme de végétal sec)

	1ère volée		3ème volée		5ème volée	
	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures
Proline	239	417	370	1030	480	704
Acide glutamique	13	66	20	65	30	70

L'accumulation de proline libre dans ces échantillons ne peut pas par conséquent s'expliquer par une diminution d'intensité des mécanismes d'utilisation.

F - UTILISATION IN VIVO DE D-L ACIDE GLUTAMIQUE 3-4- ^{14}C.

L'acide glutamique constitue un des principaux acides aminés libres du compost. En culture sur milieu semi-synthétique, il peut être, pour certaines souches d'Agaricus bisporus, à la fois une excellente source d'azote et une possible source de carbone (PIQUEMAL, 1970). L'emploi de molécules marquées a également permis de montrer que, lors de la croissance mycélienne, le squelette carboné de l'acide glutamique était incorporé dans la proline d'une part, l'ornithine et l'arginine d'autre part. Les résultats précédemment exposés ayant suggéré l'existence, dans le carpophore, de processus métaboliques analogues, j'ai été conduit à entreprendre une étude du devenir in vivo de l'acide glutamique dans les fructifications d'Agaricus bisporus.

I - PRINCIPAUX COMPOSES MARQUES.

1 - Répartition de la radioactivité dans les différentes fractions.

Au bout de 2 et 6 heures de métabolisme, la radioactivité des composés formés se répartit comme suit dans les différentes fractions (tableau XLVI).

Comparativement aux données acquises sur le catabolisme de l'arginine et de la proline, on constate que l'utilisation de l'acide glutamique 3-4- ^{14}C conduit à un marquage beaucoup plus intense des acides organiques.

La proportion d'aminoacide incorporé dans les protéines est par contre inférieure, ce qui indiquerait une plus importante participation de l'acide glutamique au métabolisme intermédiaire du champignon de couche. Enfin, la part prise par le gaz carbonique dans ce bilan est minime.

TABLEAU XLVI

Répartition, en %, de la radioactivité dans les différents groupes de composés élaborés à partir d'acide glutamique 3-4 ^{14}C.

	1ère volée		3ème volée		5ème volée	
	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures
Gaz carbonique	+	1,5	+	1,7	0,3	2,2
Composés azotés solubles	65,4	59,7	69,6	64,2	77,0	57,9
Acides aminés des protéines	3,4	13,0	3,1	14,2	3,2	14,2
Acides organiques	31,2	25,3	27,1	19,5	19,2	25,3
Corps neutres	+	0,5	+	0,4	0,3	0,4

2 - Composés azotés libres et protéiques.

L'analyse des substances azotées radioactives des fractions soluble et insoluble aboutit aux résultats groupés dans le tableau XLVII.

Dans tous les cas, les acides aspartique et γ-aminobutyrique sont les deux aminoacides libres les plus radioactifs. L'acide aspartique provient vraisemblablement, par transamination, de l'acide oxalacétique. Selon LE ROUX (1966) le passage de l'acide oxalacétique à l'acide aspartique se fait in vivo dans les fructifications d'Agaricus bisporus à une allure rapide et cette observation se trouve ainsi parfaitement confirmée. L'intervention de la glutamique décarboxylase, dont l'existence dans le champignon de couche a été signalée antérieurement (LATCHÉ, 1963), explique le marquage de l'acide γ-aminobutyrique. Cette enzyme est également présente dans le mycélium d'Agaricus bisporus (PIQUEMAL, 1970). Elle possède dans le carpophore une activité notable, se traduisant par la décarboxylation de 23 micromoles d'acide glutamique par minute et pour un poids de végétal correspondant à une millimole d'azote protéique. En fonction du temps de métabolisme, alors que la radioactivité de l'acide aspartique augmente, celle de l'acide γ-aminobutyrique diminue considérablement, ce qui laisserait supposer une utilisation assez rapide de ce dernier composé.

TABLEAU XLVII

Métabolisme de l'acide glutamique 3-4 ^{14}C : radioactivité des composés azotés solubles et insolubles en milliers d'impulsions/minute/ gramme de matériel sec.

	1ère volée		3ème volée		5ème volée	
	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures
I - Fraction soluble						
Acide γ-aminobutyrique	712	278	810	280	861	119
Proline	-	-	4,5	8	+	+
Glutamine*	39	72	50	46	24	36
Acide aspartique	566	1023	679	1403	787	1268
Asparagine	-	-	9	16	12	22
Ornithine	+	75	50	103	71	50
Citrulline	-	-	9	16	12	20
Arginine	-	-	23	86	18	36
α-Alanine	62	259	69	276	85	152
Urée	-	-	46	29	32	22
Peptide ac. aspartique-ac. glutamique-alanine	+	12	5	15	5	15
II- Fraction insoluble						
Acide glutamique	74	212	91	266	70	254
Acide aspartique	-	89	15	95	11	117
Arginine	-	-	+	75	-	59
Alanine	-	37	-	43	-	34

* La glutamine est partiellement dégradée en acide pyrrolidone carboxylique au cours des purifications préliminaires par échangeurs d'ions (ELLFOLK et SYNGE, 1955). Afin d'éviter cette source d'erreur, les radioactivités de la glutamine et de l'acide pyrrolidone carboxylique ont été déterminées à partir d'une fraction de l'extrait brut, analysé, sans traitement préalable sur résine, par chromatographie sur papier. Les mélanges solvants sont ceux préconisés par CROWLEY, MOSES et ULLRICH (1963) et par BENSON, BASSHAM, CALVIN, GOODALE, HAAS et STEPKA (1950), respectivement utilisés en première et deuxième dimensions.

Il paraît assez étonnant que l'asparagine et surtout la glutamine soient aussi faiblement radioactives. Bien que les amides constituent une importante fraction des composés azotés solubles du champignon de couche, leur élaboration à partir des acides aminés correspondants semble s'effectuer à vitesse réduite.

L'examen des résultats enregistrés pour les carpophores appartenant à différentes volées fait ressortir un accroissement, en troisième volée, des processus de synthèse. Cette remarque s'applique tout particulièrement à l'arginine et, à un degré moindre, à la proline. Dans les fructifications récoltées en début de culture, seule l'ornithine est marquée ; par contre, dans les autres échantillons, la citrulline, l'arginine et, en plus faible proportion, la proline, figurent parmi les substances élaborées à partir de l'acide glutamique 3-4-^{14}C. Enfin, on doit aussi mentionner parmi ces dernières, le peptide acide aspartique-acide glutamique-alanine dont il serait intéressant de connaître le rôle physiologique.

3 - Acides organiques marqués.

Les principaux composés marqués de la fraction anionique figurent dans le tableau XLVIII.

TABLEAU XLVIII

Métabolisme de l'acide glutamique 3-4-^{14}C : radioactivité des acides organiques, en milliers d'impulsions/minute/gramme de matériel sec.

	1ère volée		3ème volée		5ème volée	
	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures	2 heures	6 heures
Acide α-cétoglutarique	34	32	39	25	65	66
'' succinique	368	94	355	85	309	191
'' fumarique	61	74	81	90	67	105
'' malique	232	411	229	300	162	359
'' citrique	6	41	8	32	26	50
'' pyrrolidone carboxylique	30	29	49	14	45	52
'' citramalique	10	1,6	8	+	+	+
'' glycolique	25	17	10	26	8	19

Il a été montré dans la troisième partie de ce travail que l'acide glutamique est impliqué comme donneur de radicaux $-NH_2$ dans de nombreuses réactions de transamination. On aboutit de ce fait à la formation d'acide α-cétoglutarique qui est lui-même rapidement métabolisé. Le marquage des acides succinique, fumarique, malique et citrique paraît conforme au fonctionnement du cycle de KREBS. Toutefois, au bout de deux heures de métabolisme, l'acide succinique est le composé présentant en valeur absolue le marquage le plus élevé et sa radioactivité spécifique (tableau IL) est également la plus forte. Ceci pourrait suggérer, qu'en plus de sa synthèse à partir de l'acide α-cétoglutarique, grâce aux enzymes du cycle tricarboxylique, l'acide succinique tire son origine d'autres processus métaboliques.

Il est également intéressant de noter la présence, dans la fraction anionique, des acides pyrrolidone carboxylique et citramalique. Ces composés ont été identifiés par cochromatographie et leur identité a été confirmée par analyse des extraits sur gel de silice et sur résine Dowex 1.

TABLEAU IL

Radioactivité spécifique (en impulsions/minute/micromole) des intermédiaires du cycle de KREBS (temps de métabolisme : 2 heures, carpophores de première et troisième volées)

	1ère volée	3ème volée
Acide α-cétoglutarique	48.000	59.600
" succinique	59.100	67.110
" fumarique	12.810	14.630
" malique	11.950	13.520
" citrique	1.830	2.900

Les précautions prises pour éviter la transformation chimique de l'acide glutamique et de la glutamine (absence de traitement par échangeurs d'ions, voir remarque page 132) suggèrent que la formation d'acide pyrrolidone carboxylique résulte de processus enzymatiques. RATNER (1944) a observé, lorsque du D-L glutamate

était administré à des rats, que la plus grande partie de l'isomère de la série D était excrétée dans l'urine sous forme de D-pyrrolidone carboxylate. Le catalyseur responsable de cette cyclisation a été par la suite caractérisé dans plusieurs tissus animaux (MEISTER et BUCKENBERGER, 1962). En 1966, KAWAI et UEMURA ont établi que plusieurs souches de Pseudomonas alcaligenes étaient capables de se développer à partir d'acide L-pyrrolidone carboxylique comme unique source d'azote et de carbone. La première phase de cette utilisation consiste en une conversion de l'acide pyrrolidone carboxylique en acide glutamique. Il n'est pas interdit de penser, bien que cela nécessite une confirmation ultérieure, que la réaction inverse s'effectue dans les carpophores d'Agaricus bisporus.

Deux possibilités peuvent être proposées pour justifier la génèse d'acide citramalique : soit condensation de l'acétylcoenzyme A avec le pyruvate par réaction d'aldolisation (JOLCHINE, 1962 ; LIORET, 1963), soit dégradation de l'acide glutamique selon la séquence :

acide glutamique ⟶ acide mésaconique ⟶ acide citramalique,

cette dernière séquence ayant été mise en évidence par BARKER (1961) chez Clostridium tetanomorphum.

On constate (tableau XLVIII) que le marquage de l'acide citramalique diminue en fonction du temps de métabolisme. Il peut donner naissance à de l'acide pyruvique (BARKER, 1961), lui-même à l'origine de l'alanine marquée (tableau XLVII).

4 - Composés neutres.

Dans cette fraction, les deux substances renfermant du ^{14}C sont le glucose et le fructose. Leur radioactivité est toujours minime et elle n'est mesurable qu'après 8 heures de métabolisme.

II - DEVENIR DE L'ACIDE γ-AMINOBUTYRIQUE.

Les travaux de JACOBY et SCOTT (1959) et de PIETRUSKO et FOWDEN (1961) ont établi chez certains microorganismes (Pseudomonas fluorescens, Saccharomyces cerevisiae, Torulopsis utilis) l'existence des réactions enzymatiques mentionnées ci-dessous :

(a) Acide γ-aminobutyrique + acide α-cétoglutarique $\xrightarrow{\text{transaminase}}$ acide glutamique + semialdéhyde succinique

(b) Semialdéhyde succinique + $NADP^+$ + (ou NAD^+) + H_2O

$$\xrightarrow[\text{déshydrogénase}]{\text{semialdéhyde succinique}} \text{acide succinique} + NADPH_2 \text{ (ou } NADH_2)$$

La mise en évidence de processus de transamination entre l'acide γ-aminobutyrique et les acides pyruvique et α-cétoglutarique (voir pages 80-81) suggérait la possibilité d'une séquence métabolique analogue dans le champignon de couche.

Dans le but de contrôler cette hypothèse, deux séries d'expériences ont été effectuées :

1 - Utilisation de l'acide γ-aminobutyrique par des coupes de tissus frais.

Dix carpophores (troisième volée, stade II) sont découpés longitudinalement, dans leur partie centrale, en lamelles de 1 à 1,5 millimètres d'épaisseur*. Chaque lamelle est ensuite divisée en deux parts égales, la première moitié étant utilisée dans l'essai, la seconde dans le témoin. Deux lots homogènes de 15 grammes de tissus frais sont ainsi constitués.

Dans l'essai E, le végétal est mis au contact de 15 ml d'une solution tamponnée d'acide γ-aminobutyrique (concentration 0,02 M, pH 8). Cette solution est remplacée dans le témoin T par un volume égal de mélange tampon (phosphate monopotassique-phosphate disodique M/15). Après 4 heures d'incubation à 25° C et en milieu agité, on procède au dosage des acides organiques extraits selon le protocole habituel et séparés par chromatographie sur gel de silice.

La comparaison des résultats obtenus à partir de E et T permet de mettre en évidence dans l'essai la formation de 10 micromoles d'acide succinique, 3 micromoles d'acide fumarique et 41 micromoles d'acide malique.

---

* Ces valeurs ont été adoptées à la suite de l'étude de LE ROUX (1966) sur l'influence de l'épaisseur des coupes de tissus sur l'intensité respiratoire. Il ressort de ces expériences que, pour des épaisseurs comprises entre 0,7 et 2,1 millimètres, l'absorption d'oxygène de disques de plectenchyme n'est pas modifiée.

2 - Essai de mise en évidence in vitro de la semialdéhyde déshydrogénase.

Les milieux décrits dans le tableau L sont portés à 38° C pendant 4 heures.

TABLEAU L

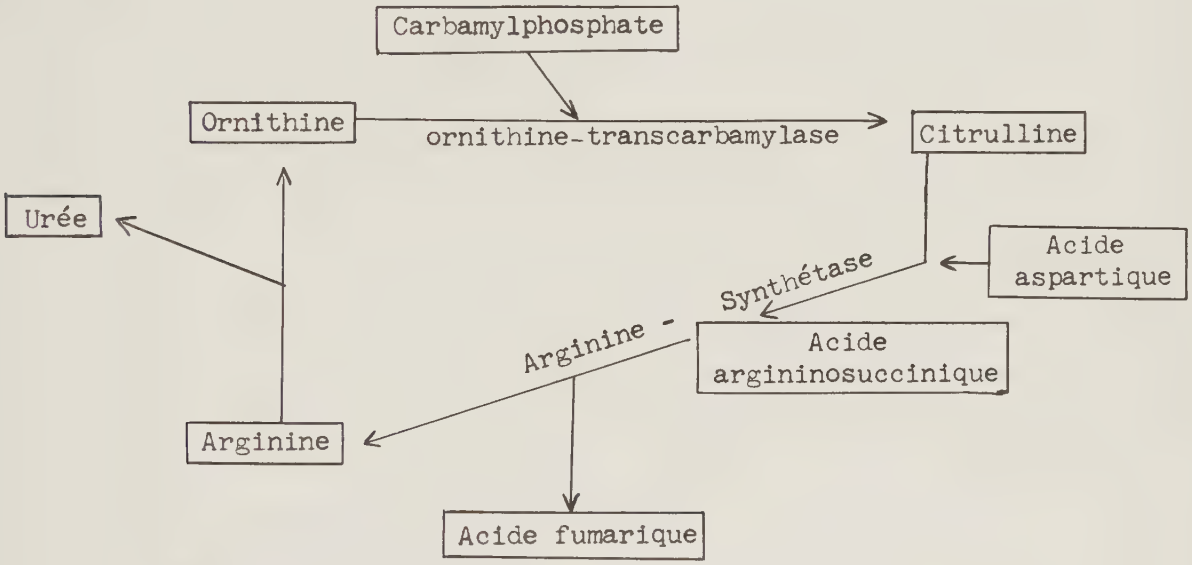
Caractérisation de la semialdéhyde déshydrogénase : composition des essais et témoins.

	Essai	Témoin T_1	Témoin T_2	Témoin T_3
Matériel végétal (mg)	20	20	20	-
Acide γ-aminobutyrique (µmoles)	50	-	50	50
" α-cétoglutarique (µmoles)	20	20	-	20
NAD^+ (µmoles)	1	1	1	1
Tampon Tris 0,1 M, pH 8 (ml)	2	2	2	2

Le matériel végétal est constitué par de la poudre obtenue par broyage du carpophore d'Agaric desséché sous vide sur chlorure de calcium. L'étude des acides organiques et des aminoacides par chromatographie sur papier aboutit à la caractérisation dans l'essai d'une apparition d'acide glutamique et d'acide succinique. Ce dernier composé provient vraisemblablement de l'oxydation de la semialdéhyde succinique, engendré sous l'action de la transaminase acide γ-aminobutyrique - acide α-cétoglutarique. Des travaux ultérieurs permettront une étude plus détaillée du phénomène.

G - ETUDE DE L'ORNITHINE TRANSCARBAMYLASE ET DE L'ARGININE SYNTHETASE.

L'utilisation in vivo d'acide glutamique 3-4 ^{14}C a conduit dans tous les échantillons à la production d'ornithine. Par contre, ce n'est que dans les carpophores de troisième et de cinquième volées qu'une élaboration d'arginine marquée a été observée. Ceci suggère une inégale activité des enzymes du cycle de KREBS et HENSELEIT (1932) permettant le passage de l'ornithine à la citrulline, puis de la citrulline à l'arginine. L'étude de ces deux biocatalyseurs, ornithine transcarbamylase et arginine synthétase, a pour but d'examiner le bien-fondé de cette hypothèse. Le schéma suivant permet de préciser cette séquence métabolique.



I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

1 - Choix du matériel enzymatique.

Les modalités de synthèse de la citrulline dans les carpophores d'Agaricus bisporus ont été précisées en 1962 par LEVENBERG. Cet auteur a montré que le groupement $-NH_2$ du carbamylphosphate provenait de la fonction amide de la glutamine. L'élaboration de citrulline nécessite la présence de glutamine, de bicarbonate, d'ornithine, d'ATP et d'un cation bivalent, Mg^{++} ou Co^{++}. Le catalyseur responsable de la réaction a été partiellement purifié. J'ai tenté d'utiliser la préparation enzymatique obtenue au terme des deux premières étapes de

purification décrites par LEVENBERG (dialyse de l'extrait végétal brut et précipitation des protéines au sulfate d'ammonium) comme matériel d'étude de l'ornithine transcarbamylase et de l'arginine synthétase. Les résultats ont été largement positifs en ce qui concerne la production de citrulline ; par contre, aucune formation d'arginine n'a pu être caractérisée à partir de cette préparation. Aussi ai-je retenu comme source d'enzyme de la poudre acétonique préparée selon REINBOTHE (1964). Un tel matériel avait été utilisé pour une étude similaire par ECKERT, KLECZKOWSKI et KATING (1966). De plus, des essais préliminaires ont permis de préciser que la poudre acétonique préparée à partir de carpophores d'Agaric (troisième volée, stade II), possédait à la fois une activité ''ornithine transcarbamylase'' et ''arginine synthétase''.

2 - Composition des milieux réactionnels -Techniques de dosage.

a - Ornithine transcarbamylase.

La composition des essais et témoins réalisés en vue de l'étude de cette enzyme figure dans le tableau LI.

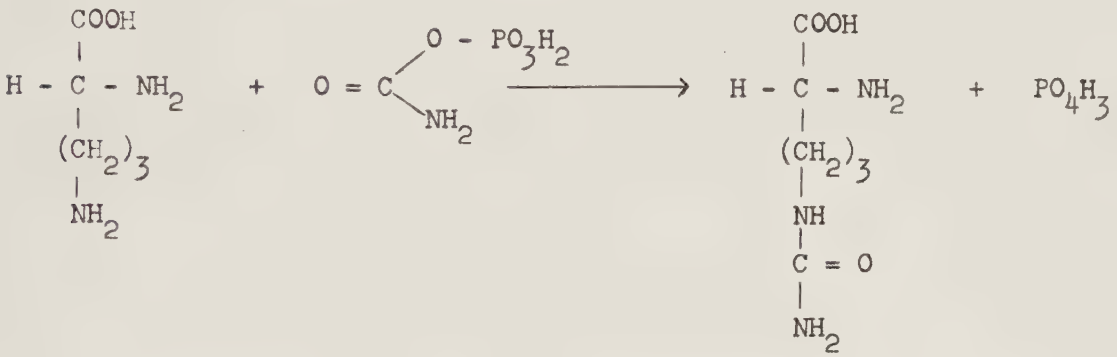
TABLEAU LI

Etude de l'ornithine transcarbamylase

	E	T_1	T_2	T_3
Matériel enzymatique (mg)	50	-	50	-
Matériel enzymatique préalablement porté 30 minutes à 100° C (mg)	-	50	-	-
Mélange tampon PO_4H_2K - PO_4HK_2 0,1 M, pH 7,4 (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Solution aqueuse 0,05 M de L-ornithine, HCl (Nutritional Biochemicals Corporation) ajustée à pH 7,4 (ml)	0,2	0,2	-	0,2
Solution aqueuse 0,05 M de carbamylphosphate, (sel de lithium, Sigma) ajustée à pH 7,4 (ml)	0,2	0,2	-	0,2
Eau distillée	1,0	1,0	1,4	1,0

Ce protocole a été établi d'après les travaux de REIFER, KLECZKOWSKI, KLIMOWICZ et ZIELINSKA (1963), TOUZÉ (1964) et ECKERT, KLECZKOWSKI et KATING (1966). Les différents milieux réactionnels sont portés pendant 30 minutes au bain-marie à 30° C. Selon REIFER et KLECZKOWSKI (1960), la formation non enzymatique de citrulline est dans ces conditions extrêmement limitée ; les résultats négatifs obtenus à partir des témoins T_1 et T_3 confirment cette observation.

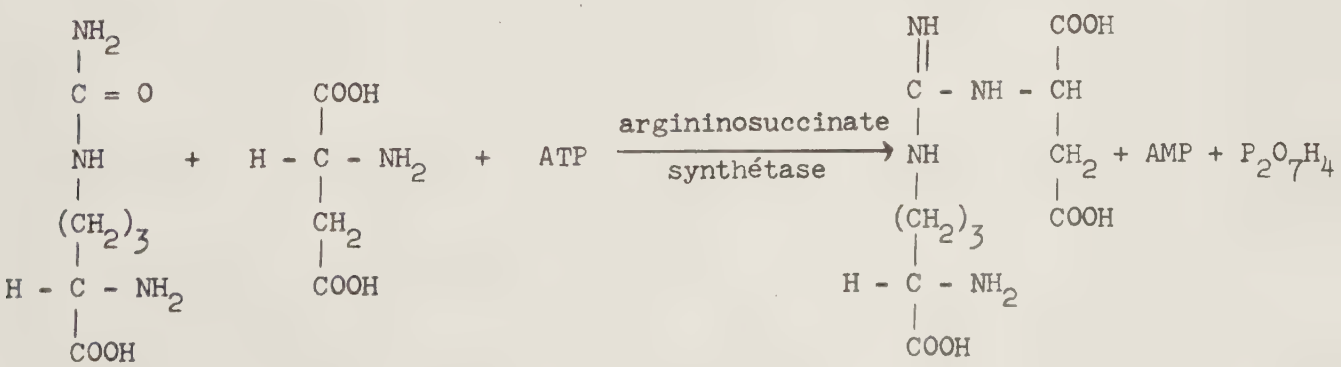
Sous l'action de l'ornithine transcarbamylase, l'ornithine réagissant avec le carbamylphosphate est convertie en citrulline.

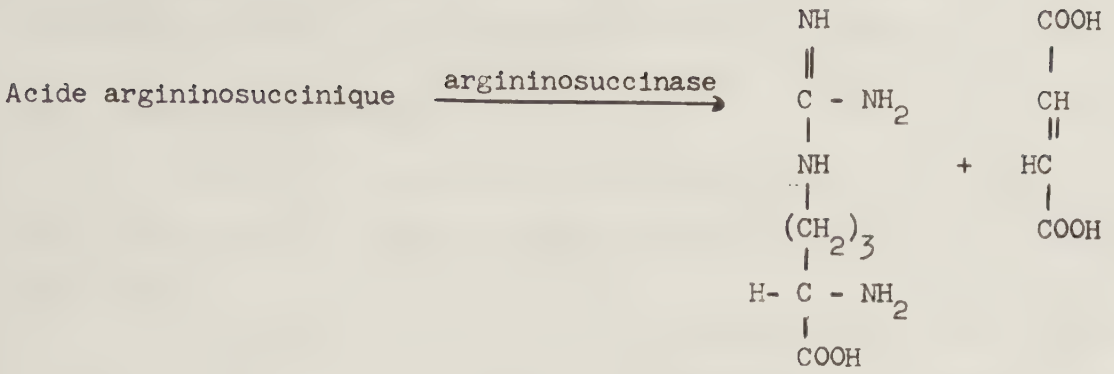


La caractérisation de l'enzyme est basée sur le dosage, selon la méthode exposée par HUNNINGHAKE et GRISOLIA (1966), de la citrulline engendrée.

b - Arginine synthétase.

La formation d'arginine s'effectue par condensation de la citrulline et de l'acide aspartique en acide argininosuccinique, ce dernier composé étant ensuite scindé en arginine et acide fumarique. Ces deux réactions sont respectivement catalysées par l'argininosuccinate synthétase et l'argininosuccinase ; les deux enzymes, dont l'action est étroitement liée, sont groupées sous le terme d'arginine synthétase.





Le protocole expérimental (tableau LII) dérive des résultats exposés par FOTYMA, KLECZKOSWKI et REIFER (1961), TOUZÉ (1964) et ECKERT, KLECZKOWSKI et KATING (1966).

TABLEAU LII

Recherche de l'arginine-synthétase

	E	T_1	T_2	T_3
Matériel enzymatique (mg)	100	-	100	-
Matériel enzymatique préalablement porté 30 minutes à 100° C (mg)	-	100	-	-
Mélange tampon PO_4H_2K - PO_4HK_2 0,1 M, pH 7,4 (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5
Solution aqueuse 0,05 M de L-citrulline (Calbiochem), ajustée à pH 7,4 (ml)	0,2	0,2	-	0,2
Solution aqueuse 0,05 M de L-acide aspartique (Sigma), ajustée à pH 7,4 (ml)	0,2	0,2	-	0,2
Solution aqueuse 0,05 M d'ATP (sel de sodium, Sigma), ajustée à pH 7,4 (ml)	0,1	0,1	-	0,1
Solution aqueuse 0,05 M de SO_4Mg, 7 H_2O (Merck), ajustée à pH 7,4 (ml)	0,2	0,2	-	0,2
Eau distillée (ml)	1,0	1,0	1,7	1,0

Après 30 minutes d'incubation à 37° C, l'arginine est dosée selon la technique de SAKAGUCHI modifiée par IZUMI (1965 a, 1965 b).

II - ACTIVITES ENZYMATIQUES.

L'étude de l'ornithine transcarbamylase et de l'arginine synthétase des fructifications d'Agaricus bisporus conduit aux données groupées dans le tableau LIII.

Les résultats sont exprimés en micromoles de composé engendré en 30 minutes pour une quantité de végétal correspondant à 1 millimole d'azote protéique.

TABLEAU LIII

Activités de l'ornithine transcarbamylase et de l'arginine synthétase dans les carpophores issus des différentes volées.

	lère volée	3ème volée	5ème volée
Ornithine transcarbamylase	38,0	36,1	35,0
Arginine synthétase	2,9	9,3	5,8

Dans tous les échantillons, l'activité de l'ornithine transcarbamylase est pratiquement constante. Par contre,celle de l'arginine synthétase présente un net optimum en troisième volée. Les milieux réactionnels (tableau LII) ont été analysés par chromatographie bi-dimensionnelle sur papier. Il m'a toujours été impossible, dans ces conditions, de caractériser une production d'acide argininosuccinique. Ceci semblerait donc indiquer que ce composé, sitôt après son apparition, est transformé en arginine.

H - CONCLUSIONS.

L'étude du métabolisme de l'arginine dans les carpophores d'Agaricus bisporus issus des poussées successives d'une même culture a permis de mettre en évidence, en troisième volée, une augmentation à la fois de l'intensité des processus d'utilisation (protéogénèse - hydrolyse en ornithine et urée) et des processus de synthèse (arginine synthétase). L'incorporation de l'arginine dans les protéines est en moyenne 1,5 fois plus élevée. Les rapports entre les activités enzymatiques correspondant aux échantillons de première et troisième volées sont respectivement pour l'arginase et l'arginine synthétase de 1,34 et 3,21. Ces valeurs sont donc nettement supérieures en ce qui concerne l'enzyme de synthèse et il paraît logique d'attribuer les accumulations d'arginine libre observées dans les fructifications de troisième volée à une biosynthèse accrue. Elle s'effectuerait à partir de l'ornithine, provenant vraisemblablement de l'acide glutamique et éventuellement de la proline. Un certain nombre de constatations sont en outre en faveur de cette hypothèse :

- dans les bilans en aminoacides libres, lorsque la proportion d'arginine croît, on observe parallèlement une diminution des teneurs en ornithine ;

- le métabolisme in vivo de l'acide glutamique marqué au ^{14}C se traduit, dans les carpophores de troisième volée, par une incorporation du radioisotope dans l'arginine ;

- l'analyse de l'évolution des composés azotés du compost en fonction du temps a montré dans la phase médiane de la culture, une utilisation plus importante d'acide glutamique. De plus, un enrichissement du compost en ce dernier composé provoque, également en troisième volée, un net accroissement de la concentration en arginine libre des champignons (voir pages 62-63).

Dans cette même série d'expériences, il avait été constaté que l'addition de créatine au milieu de culture avait une influence analogue. Les relations métaboliques existant entre la créatine et l'arginine peuvent se résumer comme suit (MEISTER, 1965) :

arginine + glycine $\rightleftharpoons$ acide guanidoacétique + ornithine

acide guanidoacétique $\xrightarrow{\text{transméthylation}}$ créatine.

La réaction de transméthylation étant jusqu'ici reconnue irréversible,

il est difficile d'imaginer un mécanisme de conversion directe créatine ——→ arginine. Des essais préliminaires, dans lesquels des coupes de tissus frais ont été mises à incuber au contact d'une solution tamponnée de créatine (technique identique à celle décrite à propos des expériences portant sur l'utilisation de l'acide γ-aminobutyrique) n'ont conduit à aucune modification des teneurs en composés solubles du végétal. De plus, des tentatives de culture in vitro du mycélium d'Agaricus bisporus en présence de créatine comme unique source d'azote se sont soldées par des résultats négatifs. Faut-il en conclure que la dégradation de la créatine est d'abord réalisée par des microorganismes présents dans le compost, le champignon de couche utilisant ensuite les produits engendrés ? Cette question paraît digne d'intérêt et je me propose de l'envisager ultérieurement.

L'augmentation des quantités de proline libre dans les échantillons de troisième volée pose enfin un problème incomplètement résolu. Les données rassemblées à la suite des expériences portant sur l'utilisation de composés marquées au ^{14}C aboutissent à des conclusions similaires à celles exposées à propos de l'arginine : accroissement en troisième volée du catabolisme et de l'anabolisme. Cependant, l'augmentation du taux de synthèse paraît assez faible et aucune étude enzymatique n'a pour l'instant été abordée. Il faut rappeler que la proline existe dans le compost en quantité notable et qu'elle est, après l'acide glutamique, l'aminoacide le plus utilisé. Son maximum d'utilisation coïncide avec la sortie de la troisième volée. On peut donc envisager qu'une élévation du taux d'absorption soit en partie responsable de l'accumulation de proline dans les carpophores.

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail s'insère dans le cadre général d'une étude de la nutrition et du métabolisme azotés des Champignons Basidiomycètes. Les fructifications du champignon de couche, Agaricus bisporus Lge, variété C 63, Le Lion, ont été retenues comme matériel végétal et leur culture a été effectuée dans des conditions identiques à celles utilisées pour leur production commerciale, en champignonnières.

Après m'être efforcé de choisir la méthode d'extraction la mieux appropriée, je me suis attaché en premier lieu à préciser la nature des principaux constituants azotés du carpophore ; j'ai toutefois limité mes investigations aux acides aminés et aux amides.

Les composés les plus abondamment représentés dans la fraction soluble sont les acides glutamique et aspartique, l'α-alanine, l'ornithine, l'arginine, la lysine, la proline, la glutamine et l'urée. On note également la présence de substances plus rarement signalées chez les végétaux : acide cystéique, cystathionine, acide α-aminoadipique. Par ailleurs, un peptide a été caractérisé et isolé : son hydrolyse libère de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de l'α-alanine.

Les échantillons jeunes sont beaucoup plus riches en aminoacides que les individus âgés, cet appauvrissement en fonction de la croissance des fructifications étant plus marqué pour le stipe et, à un degré moindre, pour la partie stérile du chapeau. En outre, la répartition des substances azotées solubles diffère de façon sensible. Le stipe se distingue par des teneurs plus élevées en acides aminés basiques et en proline. Dans la partie stérile du chapeau, prédominent les acides glutamique et aspartique, l'α-alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, les acides aminés aromatiques et l'urée. L'hyménium, où abondent également la proline, l'acide glutamique, l'acide aspartique et, dans certains cas, l'urée,est pauvre en ornithine, lysine et histidine. Ces différences, qui s'atténuent toutefois à mesure que le carpophore vieillit, s'accompagnent de variations dans le déroulement de certains processus métaboliques : ces problèmes pourraient être abordés en relation avec l'élaboration des basidiospores.

Les carpophores issus des poussées successives qui apparaissent au cours d'une même culture possèdent des caractères particuliers, morphologiques (taille, poids...) ou physiologiques (résistance aux infections parasitaires...). Les analyses effectuées à partir de la variété C 63, Le Lion, puis, à titre de comparaison, des souches 87 A et 500, Somycel, ont conduit à la mise en évidence, dans les échantillons de troisième volée, d'une augmentation quasi-générale des aminoacides solubles. Les modifications les plus marquées portent sur les concentrations en arginine et en proline et, plus faiblement, sur les teneurs en sérine, thréonine, acide γ-aminobutyrique et glycocolle. Les quantités d'alanine, d'acide aspartique et d'amides sont par contre maximales en deuxième volée, alors que lysine et ornithine diminuent régulièrement en fonction du temps de culture.

Un défaut d'incorporation des acides aminés dans les protéines ne peut expliquer ces constatations. Au contraire, les fructifications de troisième volée se caractérisent par un taux plus élevé d'azote insoluble, la composition centésimale des protéines restant par ailleurs identique dans tous les échantillons. Certaines substances, peu représentées à l'état libre, occupent dans les protéines une place non négligeable : on peut citer en particulier l'histidine, le glycocolle, la thréonine, la valine, les leucines, la phénylalanine et la tyrosine.

On pouvait se demander si les variations enregistrées dans la fraction azotée soluble des carpophores issus des poussées successives n'étaient pas la conséquence directe d'éventuels changements survenus dans le compost en cours de culture. La détermination des acides aminés et amides libres du milieu nutritif permet de répondre négativement, avec toutefois quelques réserves concernant les amides (glutamine et asparagine), dont les teneurs dans le compost et dans les carpophores évoluent de façon sensiblement parallèle. Les aminoacides existent dans le milieu essentiellement sous forme insoluble et des différences dans l'utilisation de certains composés azotés suggèrent des modifications dans le métabolisme des fructifications appartenant aux diverses volées. L'intervention de la créatine comme possible source d'azote pour Agaricus bisporus soulève en particulier une question qui n'a pas été résolue au cours de ce travail.

L'étude des réactions de transamination a été entreprise dans un double

but : déterminer la part de ces processus dans la biosynthèse des acides aminés des fructifications du champignon de couche, répondre plus particulièrement au problème posé par les variations des teneurs en glycine, sérine, alanine, acide aspartique et phénylalanine constatées en fonction du phénomène des volées.

Une méthode d'extraction et de dosage des cétoacides, appropriée au matériel végétal étudié, a été mise au point. En dehors de l'acide α-céto-ε-aminocaproïque, présent à l'état de traces, six composés ont été identifiés et dosés : acides glyoxylique, pyruvique, hydroxypyruvique, oxalacétique, α-cétoglutarique et phénylpyruvique. Leur implication dans des processus de transamination conduisant à l'élaboration des acides aminés correspondants a été établie. Ces réactions joueraient un rôle très important comparativement à d'autres voies de synthèse, amination réductrice par exemple.

L'acide glutamique constitue dans ces transferts le donneur préférentiel de groupements amino le plus souvent cité : ce résultat est à rapprocher de la place qu'occupe l'acide glutamique dans les bilans en acides aminés libres et protéiques du compost. On doit aussi insister sur la participation, plus modeste mais moins fréquemment signalée dans la littérature scientifique, de l'ornithine, la lysine, l'arginine et l'acide γ-aminobutyrique.

Il est curieux de constater que l'acide glyoxylique, acide cétonique du champignon de couche le mieux représenté, ne peut accepter que les radicaux $-NH_2$ de l'α-alanine. Cette propriété, confirmée à partir d'une préparation enzymatique partiellement purifiée, se retrouve également dans les fructifications d'un autre Basidiomycète, Boletus edulis Bull., ex Fr.. A l'aide de glyoxylate 1-2-^{14}C, j'ai pu montrer que la synthèse de glycocolle représente *in vivo* le principal devenir de l'acide glyoxylique. Les données acquises au terme de cette même expérience démontrent une intense conversion glycine-sérine, suggèrent l'existence chez Agaricus bisporus du cycle du glyoxylate et confirment enfin la réversibilité de la réaction : acide allantoïque $\rightleftharpoons$ acide glyoxylique + urée.

Le métabolisme de l'arginine et de la proline, composés qui s'accumulent à l'état libre dans les carpophores de troisième volée, a fait l'objet de la dernière partie de ce travail.

Incorporation dans les protéines et hydrolyse en ornithine et urée sont les voies préférentielles d'utilisation de l'arginine. A partir de ce métabolite marqué au radiocarbone, j'ai pu également noter une formation d'agmatine, d'acide

γ-guanidobutyrique et d'un corps identifié comme étant l'acide α-céto-δ-guanidovalérianique. Les conditions optimales d'action de l'arginase ont été précisées. L'apparition d'acide α-céto-δ-guanidovalérianique résulte, du moins en partie, d'une oxydation de l'arginine catalysée par une L-aminoacide oxydase. L'activité de cette enzyme, déterminée après précipitation au sulfate d'ammonium, est toutefois très faible. La décarboxylation de l'acide α-céto-δ-guanidovalérianique donne naissance à de l'acide γ-guanidobutyrique mais l'intervention, dans la synthèse de ce dernier composé, d'une réaction de transamidination entre l'arginine et l'acide γ-aminobutyrique ne paraît pas devoir être écartée.

L'ornithine, la citrulline et l'arginine figurent parmi les produits radioactifs formés <u>in vivo</u> dans les carpophores d'Agaric à partir d'acide glutamique 3-4 ^{14}C. Les enzymes du cycle de KREBS et HENSELEIT impliquées, ornithine transcarbamylase et arginine synthétase, ont été caractérisées <u>in vitro</u>.

L'acide glutamique peut également être à l'origine de la proline et sa décarboxylation, intense, donne naissance à de l'acide γ-aminobutyrique. Les carpophores d'<u>Agaricus bisporus</u> constituent un matériel approprié à l'étude détaillée de la séquence métabolique :

acide γ-aminobutyrique ⟶ semialdéhyde succinique ⟶ acide succinique.

L'importance biologique de ce processus dans la génèse de l'acide succinique, comparativement à d'autres voies plus classiques (cycle de KREBS, cycle du glyoxylate) sera en particulier intéressante à préciser.

Les différences dans les activités des transaminases des champignons provenant des poussées successives d'une même culture sont en parfait accord avec les variations des teneurs en glycocolle, α -alanine, sérine, acide aspartique et phénylpyruvique libres. L'accroissement des processus de synthèse, observé au niveau de l'arginine synthétase, serait également à l'origine des accumulations d'arginine dans les carpophores de troisième volée. Ces derniers se caractérisent en outre par une augmentation de l'activité arginasique, une accélération du catabolisme et de l'anabolisme de la proline, une plus importante utilisation de l'acide glutamique. L'incorporation des acides aminés dans les protéines y est également plus rapide.

Je me propose, dans des expériences ultérieures, de tenter de trouver

une explication à ces phénomènes. S'agit-il d'une influence indirecte du milieu nutritif ? La possibilité de cultiver in vitro le mycélium du champignon de couche, soit sur compost, soit sur milieu synthétique (HUMFELD et SUGIHARA, 1952) peut apporter des éléments nouveaux à la solution de ce problème et, plus généralement, contribuer à une meilleure connaissance de certains aspects de la nutrition d'Agaricus bisporus. Il serait en particulier intéressant de vérifier si des changements dans la composition en éléments minéraux du milieu de culture provoquent des modifications des teneurs en aminoacides du champignon. En ce qui concerne les plantes supérieures, HOLLEY et CAIN (1955) ont montré par exemple qu'une carence en fer s'accompagnait d'un stockage de l'arginine. Des résultats identiques ont été obtenus à l'issue de carence en soufre (CRANE et STEWARD, 1962 ; COMMANAY et BRUNEL-CAPELLE, 1966) ou en potassium (RICHARDS et COLEMAN, 1952).

D'autres aspects de la physiologie d'Agaricus bisporus seront envisagés. A la suite des travaux de GERRITS, BELS-KONING et MULLER (1965) et de GERRITS (1969), on sait que les éléments nutritifs du compost utilisés durant la croissance végétative du mycélium sont différents de ceux qui disparaissent au moment de la formation des carpophores. Cette dernière est favorisée, entre autres, par des apports d'asparagine dans le milieu (EGER, 1968). Une étude du métabolisme intermédiaire d'Agaricus bisporus, ou d'autres champignons Basidiomycètes, en fonction de l'inititation des carpophores, fournirait vraisemblablement d'utiles renseignements sur les mécanismes de la fructification. Des investigations similaires (VIALA, LACOSTE et CARLES, 1968 ; VIALA, 1969) ont révélé chez un Ascomycète, Leptosphaeria typhae, de notables variations dans la synthèse des aminoacides et le métabolisme des acides organiques des mycélium stérile et fertile.

- BIBLIOGRAPHIE -

ALTAMURA M.R., ROBBINS F.M., ANDREOTTI R.E., LONG L., Jr, et HASSELSTROM T., 1967 - Mushroom ninhydrin positive compounds : amino acids, related compounds and other nitrogenous substances found in cultivated mushroom, Agaricus campestris. J. agric. Food Chem., 15, 1040-1043.

ANDERSON A.B., 1945 - The activation of jack-bean arginase by cobalt, manganese and iron. Biochem. J., 39, 139-142.

ATKINS F.C., 1953 - Current problems of mushroom growing in Great Britain. Mushroom Science, II, 92-95.

BACHOFEN R. et RAST D., 1968 - Carboxylierungsreaktionen in Agaricus bisporus. III. Pyruvat und Phosphoenolpyruvat als CO_2 - Acceptoren. Arch. Mikrobiol., 60, 217-234.

BAIDY P., 1962 a - Sur la présence de l'arginase chez les Cryptogames vasculaires. Thèse Doct. Spécialité (Physiologie Végétale), Toulouse.

BAIDY P., 1962 b - Sur les conditions optimales d'action de l'arginase d'Aspidium aculeatum Sw.. C.R. Acad. Sci., 254, 2417-2419.

BAIDY P., 1965 - Variations saisonnières du bilan azoté et des principaux constituants azotés libres : acides aminés et amides d'Aspidium aculeatum Sw.. Physiol. vég., 3, 189-201.

BARET R., MOURGUE M. et BROC A., 1965 - L'arginine. II. Métabolisme chez les Vertébrés et les Invertébrés. Bull. Soc. Pharm. Marseille, XIV, n° 54, 103-130.

BARET R., MOURGUE M. et BROC A., 1966 - L'arginine. III. Métabolisme chez les Microorganismes. Bull. Soc. Pharm. Marseille, XV, n° 57, 19-30.

BARKER H.A., 1961 - Fermentations of nitrogenous organic compounds. The Bacteria, II, 151-207, GUNSALUS I.C. et STANIER R.V. ed., Academic Press, New-York , London.

BELL P.M., 1963 - A critical study of methods for the determination of non protein nitrogen. Anal. Biochem., 5, 443-451.

BENSON A.A., BASSHAM J.A., CALVIN M., GOODALE T.C., HAAS V.A. et STEPKA W., 1950 - The path of carbon in photosynthesis. V. Paper chromatography and radioautography of the products. J. amer. chem. Soc., 72, 1710-1718.

BISERTE G., PIAQUET-SCHOONAERT Th., BOULANGER P. et PAYSANT P., 1960 - Séparation des acides aminés en milieux biologiques complexes. V. Description d'un couplage de méthodes chromatographique et électrophorétique. J. Chromatogr., 3, 25-47.

BLOCK S.S., STEARNS T.W., STEPHENS R.L. et Mc CANDLESS R.F.J., 1953 - Mushroom mycelium experiments with submerged culture. J. Agric. Food Chem., 1, 890-893.

BOHUS G., 1959 - Investigations concerning the life processes of the cultivated mushroom. Mushroom Science, IV, 86-131.

BOLLIGER E., RAST D. et BACHOFEN R., 1966 - Synthese von Aminosäuren in Extrakten von Agaricus bisporus. Pathol. et Microbiol., 29, 742-746.

BOUDET A., 1965 - Sur quelques aspects de l'inhibition des enzymes par les tannins des feuilles de Quercus sessilis Ehrh.. Thèse Doct. Spécialité (Physiologie Végétale), Toulouse.

BOULANGER P., 1955 - Les réactions de conversion dans le métabolisme des acides aminés. Ann. Nutr. Aliment., VIII, 647-697.

BOULANGER P. et BISERTE G., 1950 - La chromatographie de partage. C.R. ann. Biochim. méd., 11e ser., 53-121.

BOVÉ J., BOVÉ C. et RAVEUX R., 1957 - Extraction, séparation et détermination de certains composés hydrosolubles dans les plantules et diverses cultures de tissus de Citrus limonum. Rev. gén. Bot., 64, 572-592.

BOVÉ J. et RAVEUX R., 1957 - La séparation et la détermination des acides carboxyliques de C_1 à C_6 par chromatographie de partage sur silice. II. Nouvelle technique proposée. Bull. Soc. Chim. Fr., 376-381.

BRAND E. et KASSELL B., 1939 -Photometric determination of tryptophane, tyrosine, diiodotyrosine, and thyroxine. J. Biol. Chem., 131, 489-502.

BRAUNSTEIN A.E. et KRITZMANN M.G., 1937 - Formation and breakdown of amino acids by intermolecular transfer of the amino group. Nature, 140, 503-504.

BRIENS M., 1967 - Contribution à l'étude du métabolisme des halophytes : les acides cétoniques de Suaeda macrocarpa Moq. et de Aster tripolium L.. C.R. Acad. Sci., 264, Série D, 2296-2299.

BRUNEL A., 1936 - Le métabolisme de l'azote d'origine purique chez les champignons. Thèse Doct. Sci. Nat., Paris.

BRUNEL A., 1948 - Traité pratique de Chimie Végétale, G. FRERE éd., Tourcoing, Vol. I.

BRUNEL A., 1949 - Traité pratique de Chimie Végétale, G. FRERE éd., Tourcoing, Vol. III.

BRUNEL A. et BRUNEL-CAPELLE G., 1951 a - Le métabolisme de l'urée et des uréides glyoxyliques chez les Végétaux. I. Les processus de synthèse chez les champignons Basidiomycètes. 76e Congrès des Sociétés Savantes, 227-236.

BRUNEL A. et BRUNEL-CAPELLE G., 1951 b - Synthèse de l'acide allantoïque chez les champignons Basidiomycètes. C.R. Acad. Sci., 232, 1130-1132.

BRUNEL A. et BRUNEL-CAPELLE G., 1965 - Activité arginasique chez Arum italicum Mill., organes reproducteurs. C.R. Acad. Sci., 261, Série D, 4213-4216.

BRUNEL A., BRUNEL-CAPELLE G. et MIQUEL A., 1967 - Biosynthèse induite de la L-arginine-uréohydrolase (arginase), de la γ-guanidinobutyrique-uréohydrolase et de la guanidinoacétique-uréohydrolase (glycocyaminase) chez Penicillium roqueforti. C.R. Acad. Sci., 264, Série D, 2777-2780.

BRUNEL-CAPELLE G., 1952 - Sur le métabolisme de l'acide glyoxylique. C.R. Acad. Sci., 234, 1466-1468.

BRUNEL-CAPELLE G., 1955 - Décarboxylation biologique de l'acide mésoxalique et contribution à l'étude du métabolisme des composés thiols chez les Végétaux. Thèse Doct. Sci. Nat., Paris.

BRUNEL-CAPELLE G. et BAILLY-FENECH G., 1967 - L'arginase de Vicia faba L., répartition et biosynthèse. C.R. Acad. Sci., 265, Série D, 792-795.

BRUNEL-CAPELLE G. et BRUNEL A., 1965 - Activité arginasique chez Arum italicum Mill., organes végétatifs. C.R. Acad. Sci., 261, Série D, 2720-2723.

BRUNEL-CAPELLE G. et DE SERRES M., 1967 - L'arginase. Sa répartition chez les plantes à bulbe : étude de quelques espèces cultivées du genre Allium. C.R. Acad. Sci., 264, Série D, 54-57.

CAMPBELL J.J.R., 1955 - Oxidative degradation of glycine by a Pseudomonas. J. biol. Chem., 217, 669-676.

CASIMIR J. et HEINEMANN P., 1953 - Contribution à l'étude du métabolisme azoté chez les champignons : Nutrition du mycélium d'Agaricus hortensis, var. alba, au moyen de différents acides aminés. Mushroom Science, II, 21-26.

CAVALLINI D. et FRONTALI N., 1954 - Quantitative determination of keto acids by paper partition chromatography. Biochim. biophys. Acta, 13, 439-445.

CHARALAMPOUS F.C., 1957 - Biochemical studies on inositol. II. Chemical degradation of inositol to glyoxylic and formic acids. J. biol. Chem., 225, 585-594.

COCHRANE V.W., 1958 - Physiology of Fungi, J. WILEY and Sons inc., New-York.

COMMANAY L. et BRUNEL-CAPELLE G., 1966 - Influence d'une carence en soufre sur quelques composés azotés de Lens culinaris Med., au cours des premiers stades de développement. C.R. Acad. Sci., 263, Série D, 872-875.

CRANE F.A. et STEWARD F.C., 1962 - Growth nutrition and metabolism of Mentha piperita L.. Effects of acute deficiency of specified nutrients on Mentha piperita L.. Cornell Experiment Station Memoir, 379, 91-129.

CROWLEY G.J., MOSES V. et ULRICH J., 1963 - A versatile solvent to replace phenol for the paper chromatography of radioactive intermediary metabolites. J. Chromatogr., 12, 219-228.

DAVIES D.D., GIOVANELLI J. et AP REES T., 1964 - Plant Biochemistry, W.O. JAMES éd., Blackwell Scientific Publications, Oxford.

DEIMAS J., 1961 - Une optique nouvelle en matière de culture du champignon de couche. Rev. hortic., 2244, 170-179.

DEIMAS J., 1966 - Quelques facteurs de production du champignon de couche. Agriculture, Fr., 293, 307-310.

DELMAS J. et POITOU N., 1965 - Les substances azotées et plus particulièrement les acides aminés dans les champignons et les composts. Mushroom Science, VI, 193-202.

DELMAS J., POITOU N. et DELPECH P., 1968 a - Variation du taux des acides aminés dans un compost destiné à la culture d'Agaricus bisporus (Lange) Sing. au cours de sa préparation et pendant la croissance du mycélium. C.R. Acad. Sci., 267, Série D, 1503-1506.

DELMAS J., POITOU N. et DELPECH P., 1968 b - Composition du sporophore d'Agaricus bisporus (Lange) Sing. en acides aminés libres et combinés et comparaison avec son milieu de culture. C.R. Acad. Sci., 267, Série D, 2147-2150.

DIXON R.O.D. et FOWDEN L., 1961 - γ-Aminobutyric acid metabolism in plants. Part. 2 - Metabolism in higher plants. Ann. Bot., 25, 514-530.

DURAND G., 1963 - Dosage de quelques acides carbonylés et de leurs uréides. Physiol. vég., 1, 95-113.

DURANTON H., 1959 - Etude du métabolisme de l'arginine libre dans les tissus du topinambour cultivés in vitro. Thèse Doct. Sci. Nat., Paris.

DUREAU P. et DELMAS J., 1962 - Essais de méthode d'analyse pour les composts à champignon de couche. Mushroom Science, V, 39-45.

ECKERT L., KLECZKOWSKI K. et KATING H., 1966 - Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoffs in Mikroorganismen. V. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus bei Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis in Abhängigkeit von der N-Quelle. Arch. Mikrobiol., 55, 54-65.

EDWARDS R.L., 1950 - Some factors affecting fructification in the mushroom. Mushroom Science, I, 37-39.

ELIFOLK N. et SYNGE R.L.M., 1955 - Detection of pyrrolidone-carboxylic acid. Biochem.J., 59, 523-526.

EGER G., 1965 - Was weiss man über Induktion und Bildung von Fruchtkörperanlangen bei Hutpilzen ? Mushroom Science, VI, 135-140.

EGER G., 1968 - Untersuchungen zum Problem der Primordien-Bildung bei Hutpilzen (Agaricales). Planta med., 99-110.

ELLIS R.J. et DAVIES D.D., 1961 - Glutamic-oxaloacetic transaminase of cauliflower. I. Purification and specificity. Biochem. J., 78, 615-630.

ESSETTE H., 1964 - Atlas mycologique. I. Les Psalliotes, LE CHEVALIER P. éd., Paris.

FERRAZ F.G.P. et RELVAS M.E.A., 1961 - Contribution à l'étude des acides organiques des milieux biologiques. I. Quelques colorations différentielles en fonction de leurs concentrations. J. Chromatogr., 6, 505-513.

FINCHAM J.R.S., 1953 - Ornithine transaminase in Neurospora and its relation to the biosynthesis of proline. Biochem. J., 53, 313-320.

FITZPATRICK W.H., ESSELEN W.B., Jr, et WEIR E., 1946 - Composition and nutritive value of mushroom protein. J. amer. diet. Ass., 22, 318-323.

FLEGG P.B., 1959 - The functions of the compost and casing layer in relation to fruiting and growth of the cultivated mushroom (Psalliota (Agaricus) hortensis). Mushroom Science, IV, 205-210.

FLEGG P.B. et GANDY D.G., 1956 - Size and form in the mushroom sporophore (Psalliota hortensis). Mushroom Science, III, 119-128.

FOSSE R., 1928 - L'urée, les Presses Universitaires, Paris.

FOSSE R., BRUNEL A. et THOMAS P.E., 1931 - Analyse quantitative de très petites quantités d'allantoïne à de très grandes dilutions. Application à l'urine humaine. C.R. Acad. Sci., 192, 1615-1621.

FOTYMA M.W., KLECZKOWSKI K. et REIFER I., 1961 - Synthesis of arginine in plant homogenates. Bull. Acad. polon. Sci., Ser. Sci. biol., 9, 61-64.

FOWDEN L., 1965 - Amino acid biosynthesis. Biosynthetic pathways in higher plants. PRIDHAM J.B. et SWAIN T. éd., Academic Press, London, New-York, 73-99.

FRANKE W., JILGE G. et EICHHORN G., 1961 - Zum enzymatischem Umsatz von C_2 - Saüren durch Mikroorganismen. III. Über Glyoxylat-Reductase aus Aspergillus niger. Arch. Mikrobiol., 39, 95-100.

GAMBORG O.L. et WETTER L.R., 1963 - An aromatic aminoacid transaminase from mung bean. Canad. J. Biochem. Physiol., 41, 1733-1740.

GARCIA I., COUERBE J. et ROCHE J., 1957 - Sur le métabolisme oxydatif de la L-arginine chez les Insectes. Activités catalasique et L-aminoacide oxydasique. C.R. Soc. Biol., 151, 1844-1847.

GARCIA I., TIXIER M. et ROCHE J., 1956 - Dégradation L-aminoacide oxydasique de la L-arginine chez les Insectes aux divers stades de leurs métamorphoses. C.R. Soc. Biol., 150, 468-470.

GEIKO N.S., KRETOVITCH V.L., POLKOVNIKOV B.D., BALANDIN A.A. et TABER A.M., 1963 - Sur la détermination des acides cétoniques par formation des 2-4 dinitrophénylhydrazones. Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R., 153, 209-211.

GERRITS J.P.G., 1969 - Organic compost constituents and water utilized by the cultivated mushroom during spawn run and cropping. Mushroom Science, VII, 111-126.

GERRITS J.P.G., BELS-KONING H.C. et MULLER F.M., 1965 - Changes in compost constituents during composting, pasteurization and cropping. Mushroom Science, VI, 225-243.

GIGLIOTTI H.J. et LEVENBERG B., 1964 a - Enzymatic transfer of the γ-glutamyl group between naturally occuring aniline and phenylhydrazine derivatives in the genus Agaricus. Biochem. biophys. Acta, 81, 618-620.

GIGLIOTTI H.J. et LEVENBERG B., 1964 b - Studies on the γ-glutamyltransferase of Agaricus bisporus. J. biol. Chem., 239, 2274-2284.

GREEN D.E., LELOIR L.F. et NOCITO V., 1945 - Transaminases. J. biol. Chem., 161, 559-582.

GUIRARD B.M. et SNELL E.E., 1964 - Vitamin B_6 function in transamination and decarboxylation reactions. Comprehensive Biochemistry, XV, FLORKIN M. et STOTZ E.H. ed., Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New-York, 108-199.

GUITTON Y., 1961 - Sur le métabolisme azoté des Gymnospermes. Mise en évidence de réactions de transamination dans les plantules de Pinus pinea L.. C.R. Acad. Sci., 253, 2583-2585.

GUITTON Y., 1964 - Métabolisme de l'arginine dans les premiers stades du développement de Pinus pinea L.. Thèse Doct. Sci. Nat., Toulouse.

HAYASHI S.I., GRANNER D.K. et TOMKINS G.M., 1967 - Tyrosine aminotransferase. Purification and characterisation. J. biol. Chem., 242, 3998-4006.

HEINEMANN P., 1953 - Etat actuel de l'étude systématique du genre Agaricus Fries sensu stricto (Psalliota). Mushroom Science, II, 6-10.

HEINEMANN P. et CASIMIR J., 1961 - Distribution des acides aminés libres dans le genre Agaricus Fr. sensu stricto (Psalliota). Rev. Mycol., XXVI, 24-33.

HILLER R.G. et WALKER D.A., 1961 - Formation of labelled aminoacids by exchange transamination. Biochem. J., 78, 56-60.

HOLGATE D.P. et GOODWIN T.W., 1965 - Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acids. Phytochemistry, 4, 831-843.

HOLLEY R.W. et CAIN S.C., 1955 - Accumulation of arginine in plants afflicted with iron-deficiency type chlorosis. Science, 121, 172-173.

HUGHES D., 1961 - A naturally occuring substrate of mushroom polyphenol oxidase. Dissert. Abstr., 22, 1814-1815.

HUGHES D.H., LYNCH D.L. et SOMERS G.F., 1958 - Chromatographic identification of the aminoacids and carbohydrates in the cultivated mushroom, Agaricus campestris L. ex Fries. J. Agric. Food. Chem., 6, 850-853.

HUGHES D.H. et RHODES Y.E., Jr., 1959 - Changes in amino acids composition of Agaricus campestris with respect to successive crops. Mushroom Science, IV, 176-182.

HULME A.C. et WOOLTORTON L.S.C., 1958 - Determination and isolation of the non volatile acids of some fruits and a study of acid changes in apples during storage. J. Sci. Food Agric., 3, 150-158.

HUMFEID H. et SUGIHARA T.F., 1952 - The nutrient requirements of Agaricus campestris grown in submerged culture. Mycologia, XLIV, 605-620.

HUNNINGHAKE D. et GRISOLIA S., 1966 - A sensitive and convenient micromethod for estimation of urea, citrulline and carbamyl derivatives. Anal. Biochem., 16, 200-205.

HUNTER A. et DOWNS C.E., 1945 - The inhibition of arginase by aminoacids. J. biol. Chem., 157, 427-445.

IWANOFF N.N., 1923 - Uber die Anhäufung und Bildung des Harnstoffs in Champignons. Biochem. Z., 143, 64-72.

IWANOFF N.N., 1927 - Der Harnstoff der Pilze und dessen Bedeutung. Z. (Hoppe-Seyler's) Physiol. Chem., 170, 274-288.

IZUMI Y., 1965 a - New Skaguchi reaction. Anal. Biochem., 10, 218-226.

IZUMI Y., 1965 b - New Sakaguchi reaction. II. Anal. Biochem., 12, 1-7.

JAKOBY W.B. et SCOTT E.M., 1959 - Aldehyde oxidation. III. Succinic semialdehyde dehydrogenase. J. biol. Chem., 234, 937-940.

JADOT J., CASIMIR J. et RENARD M., 1960 - Séparation et caractérisation du L (+) - γ- (p-hydroxy) anilide de l'acide glutamique à partir d'Agaricus hortensis. Biochim. biophys. Acta, 43, 322-328.

JOLCHINE G., 1962 - Le métabolisme de l'acide acétique dans les feuilles de Bryophyllum daigremontianum Berger. La génèse des acides organiques par différentes réactions de condensation du radical acétyle, dans les chloroplastes et dans la fraction cellulaire non chloroplastique. Bull. Soc. Chim. biol., 44, 337-364.

KANAZAWA T., KANAZAWA K. et NISHIMURA T., 1967 - Changes in contents of keto acids in Chlorella cells during their synchronized life cycle. Plant Cell Physiol., 8, 529-533.

KATUNUMA N., MATSUDA Y. et TOMINO I., 1964 - Studies on ornithine-keto acids transaminase. I. Purification and properties. J. Biochem., 56, 499-503.

KAWAI Y. et UEMURA T., 1966 - Studies on metabolism of pyrrolidone-carboxylic acid in bacteria. Part II. L-glutamic acid formation from pyrrolidone-carboxylic acid by Pseudomonas alcaligenes. Agric. biol. Chem., 30, 438-446.

KAWANO C., KATSUKI H., YOSHIDA T. et TANAKA S., 1962 - A method for extraction and determination of 2-4 dinitrophenylhydrazones of keto acids. Anal. Biochem., 3, 361-368.

KELLY R.B., DANIELS E.G. et HINMAN J.W., 1962 - Agaritine : isolation, degradation and synthesis. J. org. Chem., 27, 3229-3231.

KENTEN R.H. et MANN P.J.G., 1952 - Oxidation by α-hydroxy-acid oxidase. H_2O_2 formation in. Biochem. J., 52, 130-134.

KISSMEYER-NIELSEN E., Mc CLENDON J.H. et WOODMANSEE C.W., 1966 - Changes in amino acids and urea in the cultivated mushroom, Agaricus bisporus, as influenced by nutrient supplementation of the compost during the growth cycle. J. agric. Food Chem., 14, 633-636.

KOLESNIKOV P.A., 1954 - Formation du glycocolle à partir de l'acide glyoxylique dans les extraits de feuilles vertes. Dokl. Akad. Nauk., S.S.S.R., 96, 125-128.

KÖNIG J., 1903 - Chemie der menschlichen Nahrungs-und Genussmittel, I, p. 809. Berlin. Cité par RANDOIN et BILLAUD, 1956.

KORNBERG H.L. et BEEVERS H., 1957 - The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor bean. Biochim. biophys. Acta., 26, 531-537.

KORNBERG H.L. et COLLINS J.F., 1958 - The glyoxylate cycle in Aspergillus niger. Biochem. J., 68, 3-4.

KORNBERG H.L. et GOTTO A.M., 1961 - The metabolism of C_2 compounds in microorganisms.6. Synthesis of cell constituents from glycollate by Pseudomonas sp.. Biochem. J., 78, 69-82.

KORNBERG H.L. et MADSEN N.B., 1958 - Synthesis of C_4-dicarboxylic acids from acetate by a glyoxylate bypass of the tricarboxylic acids cycle. Biochem. J., 69, 549-568.

KORNBERG H.L. et SADLER J.R., 1961 - The metabolism of C_2- compounds in microorganisms. 8. A dicarboxylic acid cycle as a route for the oxidation of glycollate by Escherichia coli. Biochem. J., 81, 503-513.

KRAKOW G. et BARKULIS S.S., 1956 - Conversion of glyoxylate to hydroxypyruvate by extracts of Escherichia coli. Biochim. biophys. Acta, 21, 593-594.

KRAKOW G., BARKULIS S.S. et HAYASHI J.A., 1961 - Glyoxylic acid carboligase : an enzyme present in glycolate-grown Escherichia coli. J. Bacteriol., 81, 509-518.

KREBS H.A. et HENSELEIT K., 1932 - Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Z. Physiol. Chem., 210, 33-66.

KRETOVITCH V.L., 1958 - The biosynthesis of dicarboxylic amino acids and enzymatic transformations of amides in plants. Adv. in Enzymol., 20, 319-340.

KRETOVITCH V.L. et GEIKO N.S., 1964 - Sur la teneur des végétaux en acides cétoniques. Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R., 158, 471-473.

LAMBERT E.B., 1933 - Effect of excess carbon dioxide on growing mushrooms. J. Agric. Res., 47, 599-608.

LANGE J., 1926 - Studies on the Agarics of Denmark. Part. VI. Dansk Bot. Ark., 4, 1-56.

LATCHÉ J.C., 1960 - Recherches sur la transformation de l'acide glyoxylique provoquée par les Champignons Basidiomycètes. Thèse Doct. Spécialité (Physiologie Végétale), Toulouse.

LATCHÉ J.C., 1961 - Sur la transformation de l'acide glyoxylique provoquée par les Champignons Basidiomycètes. C.R. Acad. Sci., 252, 1647-1649.

LATCHÉ J.C., 1962 - Sur l'importance de la transformation de l'acide glyoxylique par les Champignons Basidiomycètes ; étude de quelques espèces communes. C.R. Acad. Sci., 254, 917-919.

LATCHÉ J.C., 1963 a - Sur la biosynthèse, par transamination, de l'alanine, des acides aspartique et glutamique et sur l'existence de la glutamique décarboxylase chez Agaricus hortensis. C.R. Acad. Sci., 257, 499-501.

LATCHÉ J.C., 1963 b - Acides aminés libres des différentes parties du carpophore d'Agaricus hortensis. Incidence sur la formation enzymatique du glycocolle par transamination. C.R. Acad. Sci., 257, 2145-2147.

LEDERER E., 1960 - Chromatographie en chimie organique et biologique, Vol. II, MASSON et Cie éd., p. 372.

LEONARD M.J.K. et BURRIS R.H., 1947 - A survey of transaminases in plants. J. biol. Chem., 170, 701-709.

LE ROUX P., 1961 - Quelques données quantitatives sur les acides organiques stables du champignon de couche (Agaricus campestris). C.R. Acad. Sci., 262, 205-207.

LE ROUX P., 1962 a - Quelques résultats concernant l'incorporation du gaz carbonique par les carpophores d'Agaricus campestris. C.R. Acad. Sci., 254, 2420-2422.

LE ROUX P., 1962 b - Métabolisme des acides organiques dans les carpophores d'Agaricus campestris. Ann. Physiol. Vég., 4, 149-160.

LE ROUX P., 1966 - Quelques aspects du métabolisme respiratoire du carpophore d'Agaricus campestris, var. bisporus Lge. Thèse Doct.Sci. Nat., Paris.

LEVENBERG B., 1962 - Role of L-glutamine as donor of carbamyl nitrogen for the enzymatic synthesis of citrulline in Agaricus bisporus. J. biol. Chem., 237, 2590-2598.

LEVENBERG B., 1961 - Structure and enzymatic cleavage of agaritine, a phenylhydrazide of L-glutamic acid isolated from Agaricaceae. J. amer. chem. Soc., 83, 503-504.

LEVENBERG B., 1964 - Isolation and structure of agaritine, γ-glutamyl substituted arylhydrazine derivative from Agaricaceae. J. biol. Chem., 239, 2267-2273.

LIORET C., 1963 - Quelques aspects du métabolisme des acides aminés chez les tissus de crown-gall de scorsonère cultivés in vitro. Bull. Soc. fr. Physiol. vég., 9, 113-121.

LOISELEUR J., 1954 - Techniques de Laboratoire. Chimie Physique-Chimie Biologique, MASSON et Cie éd., Paris.

LUGG J.W.H., 1938 - Investigations of sources of error in the estimation of tyrosine and tryptophan in complex materials, which are associated with hydrolysis. Biochem. J., 32, 775-783.

Mc CURDY H.D., Jr., et CANTINO E.C., 1960 - Isocitritase, glycine-alanine transaminase and development in Blastocladiella emersonii. Plant Physiol., 35, 463-476.

MEISTER A., 1955 - Transamination. Adv. in Enzymol., XVI, 185-246.

MEISTER A., 1965 - Biochemistry of the amino acids, 2e édit., Academic Press, New-York , London.

MEISTER A. et ABENDSCHEIN P.A., 1956 - Chromatography of alpha-keto acids 2,4-dinitrophenylhydrazones and their hydrogenation products. Anal. Chem., 28, 171-173.

MEISTER A. et BUKENBERGER M.W., 1962 - Enzymatic conversion of D-glutamic acid to D-pyrrolidone carboxylic acid by mammalian tissues. Nature, 194, 557-559.

MILLERD A., MORTON R.K. et WELLS J.R.E., 1962 - Oxalic acid synthesis in shoots of Oxalis pes-caprae (L.). Biochem. J., 86, 57-62.

MIX H., 1961 a - Nichtenzymatische Reaktionen zwischen α-Amino- und α-Ketosaüren. III. Durch Kupfer (II) - Ionen und Pyridin katalysierte Transaminierung. Z. (Hoppe-Seyler's) physiol. Chemie, 323, 173-181.

MIX H., 1961 b - Nichtenzymatische Reaktionen zwischen α-Amino- und α-Ketosaüren. III. Durch Kupfer (II) - Ionen und Pyridin katalysierte Transaminierung, Aldolkondensation und Aldolspaltung. Z. (Hoppe-Seyler's) physiol. Chemie, 325, 108-115.

MOHAMED M.S. et GREENBERG D.M., 1945 - Liver arginase. I. Preparation of extracts of high potency, chemical properties, activation, inhibition and pH activity. Arch. Biochem. Biophys., 8, 349-364.

MONTANT C., 1964 - Influence de la nature de la source nutritive azotée sur la croissance des Adelomycètes. L'activité transaminasique du mycélium intact a-t-elle un rapport avec l'utilisation des acides aminés par le Trichothecium roseum ? C.R. Acad. Sci., 258, 1599-1601.

NAKADA M., 1954 - Med. J. Osaka Univ., 5, 353. Cité par REINBOTHE H., 1964.

NAKADA H.P. et WEINHOUSE S., 1953 - Non enzymatic transaminations with glyoxylic acid and various amino acids. J. biol. Chem., 204, 831-838.

O'DONOGHUE D.C., 1962 - New light on fruit body initiation. Mushroom Science, V, 247-249.

PAUL E.A. et SCHMIDT E.L., 1960 - Extraction of free amino acids from soil. Soil Sci. Soc. Proc., 24, 195-198.

PIETRUSZKO R. et FOWDEN L., 1961 - γ-Aminobutyric acid metabolism in plants. Part. I. Metabolism in Yeasts. Ann. Bot., 25, 491-511.

PIKKARAINEN J. et KULONEN F., 1959 - Artefacts from methionine in acid hydrolysis and chromatography. Ann. Med. Exper. Biol. Fenn., 37, 382-86.

PIQUEMAL M., 1970 - Sur le métabolisme de l'acide glutamique, source d'azote et de carbone pour le mycélium d'Agaricus bisporus Lge. Thèse Doct. Spécialité (Physiologie Végétale), Toulouse.

RADIN N.S. et METZLER D.T., 1955 - Sodium glyoxylate monohydrate. Biochemical preparations, W.W. Westerfield ed., 4, 60-68.

RANDOIN L. et BILLAUD S., 1956 - Composition chimique et valeur nutritive du champignon de couche. Mushroom Science, III, 59-79.

RAST D., 1961 - Atmungsmechanismen des Kulturchampignon (Agaricus campester). Ber. schweiz. bot. Gesellsch., 71, 209-301.

RAST D. et BACHOFEN R., 1967 - Carboxylierungsreaktionen in Agaricus bisporus. II. Aceton als ein CO_2-Acceptor. Arch. Mikrobiol., 58, 339-356.

RATNER S., 1944 - Conversion of D-glutamic acid to pyrrolidone-carboxylic acid by the rat. J. biol. Chem., 152, 559-564.

RAVEUX R. et BOVÉ J., 1957 - La séparation et la détermination des acides carboxyliques de C_1 à C_6 par chromatographie de partage sur colonne de silice. 1. Etude générale. Bull. Soc. Chim. Fr., 369-376.

REEVES H.C. et AJL S.J., 1962 - Interrelationships beetwen the tricarboxylic acids and glyoxylate cycles studies with bacterial autotrophs. Canad. J. Microbiol., 8, 241-247.

REIFER I. et KLECZKOWSKI K., 1960 - Enzymatische und nichtenzymatische Citrullinsynthese. Z. Naturforsch., 7, 431-434.

REIFER I., KLECZKOWSKI K., KLIMOWICZ E. et ZIELINSKA K., 1963 - Ornithine carbamoyltransferase in higher plants. Acta biochim. polon., X, 151-156.

REINBOTHE H., 1964 - Urea metabolism in Basidiomycetes. II. Formation of γ-guanidobutyric acid in fruit bodies of Lycoperdon. Phytochemistry, 3, 327-333.

REINBOTHE H. et TSCHIERSCH B., 1962 - Harnstoff-Metabolismus bei Basidiomyceten. I. Zur Harnstoff-Biosynthese in Agaricus bisporus Lge und Lycoperdon perlatum Pers.. Flora, 152, 423-446.

REINBOTHE H., WASTERNACK C. et MIERSCH J., 1967 - Harnstoff-Metabolismus bei Basidiomyceten. IV. Untersuchungen zur Physiologie des Harnstoffs. Flora, 158, 27-57.

RICHARDS F.J. et COLEMAN R.G., 1952 - Occurence of putrescine in potassium deficient barley. Nature, 170, 460-470.

RICHARDSON K.E. et TOLBERT N.E., 1961 - Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxydase. J. biol. Chem., 236, 1280-1284.

ROCHE J., THOAI N.V. et GLAHN P., 1952 - Sur la L-aminoacide oxydase de nombreux Invertébrés marins. Experientia, 8, 428-429.

ROCHE J., THOAI N.V. et HATT J.L., 1954 - Métabolisme des dérivés guanidylés. III. Analyse chromatographique des dérivés guanidylés. Biochim. biophys. Acta, 14, 71-88.

ROUX L. et LESAINT C., 1959 - Mise au point d'une technique de détermination des acides organiques chez les végétaux. Ann. Physiol. vég., I, 83-91.

SALTET R.H., 1885 - Arch. Hyg., 3, 433 - Cité par FITZPATRICK W.H., ESSELEN W.B., Jr., et WEIR E., 1946.

SAN ANTONIO J.P., 1966 - Effects of injection of nutrient solutions into compost on the yield of mushroom (Agaricus bisporus). Amer. Soc. hortic. Sci., 89, 415-422.

SANDWAL B.D. et MADHU LATA, 1964 - Enzymes of aminoacid metabolism. Part. I. Enzymes of deamination, decarboxylation, transmethylation and intermediary metabolism. In PAECH K. et TRACEY M.V., Modern methods of plant analysis, VII, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 290-360.

SANDWALL B.D., ZINK M.W. et DIN G., 1964 - Enzymes of aminoacid metabolism. Part 2. Transaminases and racemases. In PAECH K. et TRACEY M.V., Modern methods of plant analysis, VII, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 361-391.

SANGER F., 1952 - The arrangement of amino acids in proteins. Adv. Protein Chem., VII, 1-67.

SASTRY L.V.S. et RAMAKRISHNAN T., 1961 - A metal-dependent glutamic-glycine transaminase of green plants (Phaseolus radiatus). J. Sci. industr. Res., 20, 277-283.

SCHAEFFER J. et MOELLER F., 1938 - Beitrag zur Psalliota - Forschung. Ann. Mycol., 36, 64-82.

SCOTT E.M. et JAKOBY W.B., 1959 - Soluble γ-aminobutyric-glutamic transaminase from Pseudomonas fluorescens. J. biol. Chem., 234, 932-936.

SERRES M.,DE,et BRUNEL-CAPELLE, 1966 - L'arginase : sa présence chez la Jacinthe l'Innocence et les variations de son activité de la mise en végétation à la fructification. C.R. Acad. Sci., 262, 1098-1101.

SHER I.H. et MALLETTE M.F., 1954 - Purification and study of L-arginine decarboxylase from Escherichia coli. Arch. Biochem. Biophys., 53, 370-380.

SINGER R., 1962 - The Agaricales in modern taxonomy, 2e édit., CRAMER J. publ., Weinheim.

SINHA S.K. et COSSINS E.A., 1965 - The importance of glyoxylate in amino acid biosynthesis in plants. Biochem. J., 96, 254-261.

SINHA S.K., SIROHI G.S. et ABROL Y.P., 1967 - Studies on phenylpyruvate transaminase in plant tissue homogenates. Indian J. exper. Biol., 5, 190-191.

SMITH I., 1960 - Chromatographic and electrophoretic techniques, Interscience Publishers, New-York.

SPACKMANN D.H., STEIN W.H. et MOORE S., 1958 - Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal., Chem., 30, 1190-1210.

STAFFORD H.A., 1957 - Tartaric acid deshydrogenase activity in higher plants. Plant Physiol., 32, 338-345.

STOCK C.H., PERKINS M.E. et HELLERMAN L., 1938 - Activation of enzymes. IV. The jack-bean arginolytic enzyme. J. biol. Chem., 125, 753-769.

THOAI N.V., HATT J.L. et TRAN TI AN, 1956 - Métabolisme des dérivés guanidylés. V. Oxydation enzymatique de l'arginine en guanidobutyramide. Biochim. biophys. Acta, 22, 116-123.

THOAI N.V. et OLOMUCKI A., 1962 - Arginine décarboxylase. I. Caractères et nature de l'enzyme. Biochim. biophys. Acta, 59, 533-544.

THOAI N.V., ROBIN Y. et PRADEL L.A., 1957 - Métabolisme oxydatif de la L-arginine chez la Limnée, Limnaea stagnalis L. II. Oxydation en guanidobutyramide. C.R. Soc. Biol., 151, 2097-2098.

THOAI N.V., THOME-BAU F. et DANG BA PHO, 1962 - Rôle biologique de la γ-guanidobutyramide chez Streptomyces griseus. Biochim. biophys. Acta, 63, 128-135.

TOUZE A., 1964 - L'anthracnose du Melon. Etude de quelques manifestations physiologiques. Thèse Doct. Sci. Nat., Toulouse.

TOUZE-SOULET J.M., 1964 - Morphogénie et métabolisme de deux Hypomyces : H. chrysospermus vivant en saprophyte et H. chlorinus vivant en parasite sur Boletus edulis. Thèse Doct. Sci. Nat., Toulouse.

TOWERS G.H.N., THOMPSON J.F. et STEWART F.C., 1954 - The detection of the keto-acids of plants. A procedure based on their conversion to amino acids. J. amer. chem. Soc., 76, 2392-2396.

TRESCHOW C., 1944 - Nutrition of the cultivated mushroom. Dansk. bot. Ark., 11, n° 6, 1-180.

TSCHIERPE H.J., 1959 a - Die Bedeutung des Kohlendioxyds für den Kulturchampignon. Die Gartenbauwissenschaft, 24, 18-75.

TSCHIERPE H.J., 1959 b - Die CO_2 - Verhältnisse beim Anbau des Kulturchampignons. Mushroom Science, IV, 188-197.

TSU-NING TSAO G., 1963 - Production of oxalic acid by a strain of Agaricus campestris. Appl. Microbiol., 11, p. 255.

TUBOI S. et KIRUCHI G., 1962 - Enzymic cleavage of malate to glyoxylate and acetylcoenzyme A. Biochim. biophys. Acta, 62, 188-190.

TUGAYE M.T. et TOUZE A., 1967 - Sur les composés azotés des conidies de Colletotrichum lagenarium (Pass) Ell. et Halst. : comparaison de différentes méthodes d'extraction. C.R. Acad. Sci. 264, Série D, 2292-2295.

URAYAMA T., 1965 - Initiation of pinheads in Psilocybe panaeoliformis caused by certain bacteria. Mushroom Science, VI, 141-156.

USPENSKAYA Z.V., KRETOVITCH V.L. et KASHKARAEVA K.I., 1965 - Enzymatic transamination of phenylpyruvic acid in plants. Biokhimija, 30, 790-800.

VIALA G., 1969 - La synthèse des acides aminés au cours du développement de Leptosphaeria typhae (Auersw.) Karsten. C.R. Acad. Sci., 268, Série D, 298-301.

VIALA G., LACOSTE L. et CARLES J., 1968 - Evolution des acides organiques mycéliens chez le Leptosphaeria typhae (Auersw.) Karsten, cultivé à la lumière et à l'obscurité. C.R. Acad. Sci., 267, Série D, 1230-1233.

VIGNEAUD V., DU BROWN G.B. et CHANDLER J.P., 1942 - The synthesis of S- (β-amino β-carboxyethyl) homocysteine and its replacement by cystine in the diet. J. biol. Chem., 143, 59-72.

VIRTANEN A.I., MIETTINEN J.K. et KUNTTU H., 1953 - α-Keto-acids in green plants. Acta chem. scand., 7, 38-44.

VOGEL H.J., 1964 - Distribution of lysine pathways among fungi : evolutionary implications. Amer. Naturalist, 98, 435-446.

VOGEL R.H. et KOPAC M.J., 1959 - Glutamic γ-semialdehyde in arginine and proline synthesis of Neurospora : a mutant-tracer analysis. Biochim. biophys. Acta, 36, 505-510.

VOGEL R.H. et KOPAC M.J., 1960 - Some properties of ornithine δ-transaminase from Neurospora. Biochim. biophys. Acta, 37, 539-540.

VOGELS D.T., 1963 - On the microbial metabolism of allantoin. Thèse Doct. Sci. Nat., Delft.

WALKER D.A. et RANSON S.L., 1958 - Physiological studies on acid metabolism in green plants. VI. Transaminases in cell-free extracts from Kalanchoë leaves. Plant Physiol., 33, 226-230.

WALKER J.B., 1958 - Further studies on the mechanism of transamidinase action : transamidination in Streptomyces griseus. J. biol. Chem., 231, 1-9.

WASTERNACK C. et REINBOTHE H., 1967 - Harnstoff-Metabolismus bei Basidiomyceten. III. Untersuchungen zur Harnstoffsynthese aus Pyrimidinen in Fruchtkörpern von Agaricus bisporus Lange. Flora, 158, 1-26.

WEHRLI M. et RAST D., 1967 - Stoffwechsel von $^{14}CO_2$ in Plectenchymsnitten von Agaricus bisporus. Z. Pflanzenphysiol., 56, 325-339.

WILSON D.G., KING K.W. et BURRIS R.H., 1954 - Transamination reactions in plants. J. biol. Chem., 208, 863-874.

YAMAMOTO S., ERITATE A. et MIWA T., 1953 - Formation d'urée chez les champignons supérieurs. Teneurs en urée et activité arginasique. Bot. Mag., 66, 234-238.

ZELITCH I., 1953 - Oxidation and reduction of glycolic and glyoxylic acids in plants. Glyoxylic acid reductase. J. biol. Chem., 201, 719-729.

ZELITCH I. et GOTTO A.M., 1962 - Properties of a new glyoxylate reductase from leaves. Biochem. J., 84, 541-546.

ZELITCH I. et OCHOA S., 1953 - Oxidation and reduction of glyoxylic and glycolic acids in plants. Glycolic acid oxidase. J. biol. Chem., 201, 707-718.

TABLE DES MATIERES

Pages

Introduction 1

Le matériel végétal 5

PREMIERE PARTIE

PRINCIPAUX CONSTITUANTS AZOTES D'Agaricus bisporus. LEURS VARIATIONS EN FONCTION DU PHENOMENE DES VOLEES

A - Données analytiques concernant les composés azotés des champignons du genre Agaricus 14

B - Techniques d'extraction et dosage des différentes formes d'azote et des composés azotés 17

C - Formes d'azote et principaux constituants azotés 22

D - Evolution des acides aminés et amides libres en fonction de la croissance du carpophore - Leur répartition dans les différentes parties du champignon 34

E - Conclusions 46

DEUXIEME PARTIE

INCIDENCE DE LA COMPOSITION DU COMPOST DE CULTURE SUR LES TENEURS EN ACIDES AMINES LIBRES DES CARPOPHORES D'Agaricus bisporus

A - Matériel d'étude et techniques utilisées 50

B - Evolution,en fonction du temps de culture, de quelques constituants azotés du compost 54

C - Additions au compost d'éléments nutritifs azotés.
Leur répercussion sur la composition des carpophores 61

D - Conclusions 63

TROISIEME PARTIE

IMPORTANCE DES REACTIONS DE TRANSAMINATION DANS LA BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES D'Agaricus bisporus.

A - Etude des acides cétoniques 67

B - Etude comparative des acides organiques non cétoniques 74

C - Biosynthèse des acides aminés par transamination 76

D - Métabolisme de l'acide glyoxylique 85

E - Conclusions 104

QUATRIEME PARTIE

METABOLISME DE L'ARGININE ET DE LA PROLINE

A - Techniques utilisées 107

B - Catabolisme de l'arginine U-^{14}C et guanido-^{14}C 108

C - Dégradation de l'arginine en ornithine et urée : étude de l'arginase 117

D - Désamination oxydative de l'arginine : mise en évidence de l'enzyme 122

E - Catabolisme de la proline U-^{14}C 127

F - Utilisation in vivo de D-L acide glutamique 3-4 ^{14}C 130

G - Etude de l'ornithine transcarbamylase et de l'arginine synthétase 138

H - Conclusions 143

Résumé et conclusions générales 145

Bibliographie 150

AUTORISATION DE SOUTENANCE

ACCORDEE.

TOULOUSE, le 21 MAI 1970

Le Président du Conseil Transitoire,

F. MATHIS